

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/36788 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/82

PEREZ, Pascual [FR/FR]; 17 chemin de la Pradelle,
Varenne, F-63450 CHANONAT (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03439

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc., Cabinet
HARLE et PHELIP, 7 rue de Madrid, F-75008 PARIS
(FR).

(22) Date de dépôt international :

6 novembre 2001 (06.11.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/14214 6 novembre 2000 (06.11.2000) FR
00/16602 19 décembre 2000 (19.12.2000) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147 rue de l'Uni-
versité, F-75338 PARIS cedex 07 (FR). CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
[FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS cedex 16
(FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
(ENSL) [FR/FR]; 46 allée d'Italie, F-69364 LYON cedex
07 (FR). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE
LYON (UCBL) [FR/FR]; Maison Condorcet, 43 boule-
vard du 11 novembre 1918, F-69622 VILLEURBANNE
cedex (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport
- avec la partie réservée au listage des séquences de la de-
scription publiée séparément sous forme électronique et
disponible sur demande auprès du Bureau international

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : RO-
GOWSKY, Peter [DE/FR]; 31 rue André Bollier, F-69007
LYON (FR). MAGNARD, Jean-Louis [FR/FR]; 1 av-
enue Charles André, F-69230 ST. GENIS LAVAL (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions; se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES SPECIFICALLY EXPRESSED IN CELLS OF THE TRANSFER ZONE OF
A PLANT SEED AND USES THEREOF

WO 02/36788 A2

(54) Titre : ACIDES NUCLÉIQUES ET POLYPEPTIDES EXPRIMÉS SPÉCIFIQUEMENT DANS LES CELLULES DE LA
ZONE DE TRANSFERT D'UN GRAIN DE PLANTE ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns nucleic acids specifically expressed in the transfer zone of a plant seed, preferably nucleic
acids constituting DD1-a and DD1-b genes of corn. The invention also concerns recombinant cloning and/or expression vectors
comprising a nucleic acid of the invention and host cells transformed by a nucleic acid or a recombinant vector of the invention, in
particular host cells of plant origin.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des acides nucléiques exprimés spécifiquement dans la zone de transfert d'un grain de
plante, de préférence des acides nucléiques constitutifs des gènes DD1-a et DD1-b du maïs. L'invention est également relative à des
vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'invention ainsi qu'à des cellules hôtes
transformées par un acide nucléique ou un vecteur recombinant de l'invention, en particulier des cellules hôtes d'origine végétale.

**Acides nucléiques et polypeptides exprimés
spécifiquement dans les cellules de la zone de transfert
d'un grain de plante et leurs applications**

5 La présente invention concerne des acides nucléiques exprimés spécifiquement dans la zone de transfert d'un grain de plante, de préférence des acides nucléiques constitutifs des gènes DD1-a et DD1-b du maïs.

10 L'invention est également relative à des vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'invention ainsi qu'à des cellules hôtes transformées par un acide nucléique ou un vecteur recombinant de l'invention, en particulier des cellules hôtes d'origine végétale.

15 L'invention a également pour objet une plante transformée par un acide nucléique ou un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus ainsi que leurs procédés d'obtention.

 L'invention a également trait à un polypeptide codé par un acide nucléique selon l'invention.

20 **DESCRIPTION DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE**

 Les angiospermes, ou plantes à fleurs, se caractérisent par leur mode de reproduction sexué par double fécondation. Deux gamètes mâles sont transportés par le tube pollinique et pénètrent dans l'ovule, puis dans le sac embryonnaire. Tandis que l'un va féconder l'oosphère pour donner un embryon diploïde, l'autre s'unit aux deux noyaux polaires de la cellule centrale, permettant ainsi la formation d'un deuxième organisme, celui-ci triploïde, appelé albumen ou embryon accessoire. Pendant la phase précoce de développement, de 0 à 12 JAP (jour après pollinisation), après un développement syncitial, l'albumen se cellularise, et des territoires cellulaires se différencient au sein de cet organisme principalement en quatre zones. L'une de ces zones est l'albumen amylicé, qui à maturité occupe environ les deux tiers du volume du grain et est un lieu de stockage des différentes substances de réserve dont
35 l'amidon. Une seconde zone principale est la couche à aleurone, constituée des cellules à la périphérie de l'albumen et qui synthétise des

enzymes hydrolytiques essentielles lors de la mobilisation des réserves nécessaires à la germination. Une troisième zone principale est la zone ESR (« embryo surrounding region ») qui entoure l'embryon, puis se limite au pourtour du suspenseur à partir de sept JAP et est formée de
5 petites cellules au cytoplasme dense qui serait impliqué dans le transfert de métabolites vers l'embryon.

La quatrième zone principale consiste en la zone de transfert qui permet le passage de nutriments depuis les tissus maternels jusqu'à l'albumen et l'embryon en développement.

10 C'est lors de la phase précoce du développement que se mettent en place les structures majeures qui constitueront le futur grain. Or, très peu de gènes spécifiques de cette phase sont connus, et leur fonction n'a pas été déterminée.

La zone de transfert est l'endroit clef qui préside au contrôle de
15 la quantité et/ou de la qualité des métabolites qui transitent de la plante mère vers le grain.

Il existe un besoin dans l'état de la technique de disposer de séquences régulatrices s'exprimant de manière prépondérante, ou même de manière exclusive, dans la zone de transfert, qui puissent être
20 intégrées dans des cassettes d'expression comprenant de telles séquences régulatrices contrôlant l'expression d'un gène d'intérêt, afin de modifier qualitativement ou quantitativement le contenu en métabolites de l'albumen du grain, en vue de l'obtention de grains matures, en particulier de céréales, ayant des caractéristiques de
25 constitution améliorées, par exemple nutritives ou industrielles.

Il existe également un besoin dans l'état de la technique d'identifier des protéines exprimées spécifiquement dans la zone de transfert pendant la formation de l'albumen, qui sont susceptibles d'être
impliquées dans le passage de nutriments de la plante mère vers
30 l'albumen en développement, et dont une modulation de l'expression permettrait de contrôler la qualité ou la quantité de nutriments présente dans l'albumen du grain mature.

A la connaissance du demandeur, seules quelques protéines ont été décrites dans l'état de la technique comme étant exprimées de
35 manière prépondérante dans la zone de transfert du grain. L'article de

HUEROS et al. (1999a) concerne l'étude de l'expression du gène BETL1 de maïs et divulgue qu'une séquence de 985 bp localisée en amont du gène BETL1a peut contrôler l'expression d'un gène rapporteur dans des plants de maïs transgéniques. Toutefois, la séquence nucléotidique du promoteur du gène BETL1a n'est pas décrite dans cet article.

L'article de HUEROS et al. (1995) décrit la protéine BETL1 ayant une séquence de 85 acides aminés de longueur, ainsi que la séquence nucléotidique codant pour cette protéine et montre l'expression du gène BETL1 dans les cellules de transfert de l'endosperme du maïs. Cet article divulgue la séquence de l'ARN messenger qui constitue le produit de transcription du gène BETL1 mais ne décrit aucune séquence génomique de ce gène.

L'article de HUEROS et al. (1999b) présente la séquence en acides aminés des protéines BETL-2, BETL-3 et BETL-4 qui sont également exprimés principalement dans la zone de transfert du grain. Cet article décrit également de courtes séquences nucléotidiques partielles localisées en amont de ces gènes susceptibles d'intervenir dans la régulation de leur expression dans la plante. Toutefois, aucune séquence complète d'un promoteur fonctionnel n'est décrite.

Le demandeur s'est attaché à identifier et caractériser de nouveaux gènes exprimés spécifiquement dans les cellules de la zone de transfert du grain, tout particulièrement pendant le développement de l'albumen, dans le but d'identifier:

a) des séquences régulatrices spécifiquement exprimées dans la zone de transfert du grain qui peuvent être utilisées pour contrôler l'expression de séquences d'intérêt, préférentiellement de séquences codant pour des protéines, par exemple des enzymes, des protéines impliquées dans la défense de la plante vis-à-vis de stress externes tels que des pathogènes, des protéines signal intervenant dans la communication entre la plante mère et l'albumen ou l'embryon ou encore entre l'albumen et l'embryon, des protéines marqueurs (luciférase, GUS, GFP, etc...) des protéines cytotoxiques (Barnase, toxine diphtérique, etc.). Parmi les enzymes, on peut citer celles permettant de modifier la quantité ou la qualité des métabolites transférés de la plante mère vers

l'albumen en développement afin d'obtenir des grains matures ayant des caractéristiques, notamment nutritives ou industrielles améliorées.

- b) des séquences codant pour des protéines qui sont naturellement exprimées dans la zone de transfert du grain et qui sont susceptibles d'être impliquées dans le transfert de métabolites de la plante mère vers l'albumen en développement ou encore dans la défense des plantes contre des pathogènes ou encore la signalisation ainsi que les acides nucléiques codant pour de telles protéines, qui peuvent être placés sous le contrôle de promoteurs, le cas échéant de promoteurs inductibles, permettant de modifier la qualité ou la quantité des métabolites transférés de la plante mère vers l'albumen en développement ou encore d'accroître la résistance de la plante ainsi transformée à certains pathogènes ou d'influencer le développement de l'embryon ou de l'albumen.

15

DESCRIPTION DE L'INVENTION

- Le demandeur a ainsi montré selon l'invention que deux gènes très fortement homologues, respectivement désignés DD1-a et DD1-b, étaient exprimés de manière spécifique dans la zone de transfert du grain en développement chez le maïs et a isolé et caractérisé ces séquences ainsi que celles des protéines codées par les gènes DD1-a et DD1-b.

- Le demandeur a également caractérisé les séquences régulatrices localisées en amont des deux gènes.

Les séquences nucléotidiques des gènes DD1-a et DD1-b possèdent moins de 60% d'homologie avec les séquences des gènes BETL décrites par HUEROS et al. précédemment cités.

- En outre, les gènes DD1-a et DD1-b sont exprimés plus précocement (Jour 7 après pollinisation) que les gènes BETL (Jour 10 après pollinisation).

- Les résultats d'hybridation in situ et d'amplification par RT-PCR montrent que les gènes DD1-a et DD1-b sont exprimés avant la visualisation histochimique d'une zone basale de transfert de l'albumen complètement formée et définie.

L'expression forte et précoce des gènes DD1-a et DD1-b contrôlée par leurs séquences régulatrices respectives, montre que ces deux gènes sont d'un grand intérêt industriel pour modifier les qualités et les caractéristiques de la zone de transfert qui est reconnue comme
5 l'élément clef du remplissage du grain.

ACIDES NUCLEIQUES DES GENES DD1-a et DD1-b SELON L'INVENTION.

10 Les séquences nucléotidiques des deux gènes DD1-a et DD1-b comprennent chacune, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', (i) la séquence régulatrice permettant l'expression spécifique du gène dans la zone de transfert, (ii) une séquence codante comprenant les exons et les introns du gène et (iii) une séquence non codante en aval du dernier
15 exon du gène.

La séquence du gène DD1-a selon l'invention est référencée comme la séquence SEQ ID N°1 du listage de séquences.

La séquence du gène DD1-b selon l'invention est référencée comme la séquence SEQ ID N°2 du listage de séquences.

20 Ainsi, un premier objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique.

25 L'invention concerne aussi un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique tel que défini ci-dessus.

Selon l'invention, toute technique classique de biologie moléculaire, de microbiologie et d'ADN recombinant connue de l'homme du métier peut être utilisée. De telles techniques sont décrites par
30 exemple par SAMBROOK et al. (1989), GLOVER (1985), GAIT (1984), HAMES et HIGGINS (1985a), HAMES et HIGGINS (1984), BERBAL (1984) et AUSUBEL et al. (1994).

De manière préférée, tout acide nucléique et tout polypeptide selon l'invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

Le terme « isolé » au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement). Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante n'est pas isolé.

5 Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante est isolé. Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne
10 constitue pas son environnement naturel.

Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide ou un polypeptide est à l'état purifié après
15 purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement quatre ou cinq ordres de grandeur.

Aux fins de la présente description, l'expression « séquence nucléotidique » peut être employée pour désigner indifféremment un
20 polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression « séquence nucléotidique » englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Les termes « acide nucléique », « polynucléotide », « oligonucléotide » ou encore « séquence nucléotidique » englobent des
25 séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

Le terme « nucléotide » désigne à la fois les nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent
30 au moins une modification telle que (i) un analogue d'une purine, (ii) un analogue d'une pyrimidine, ou (iii) un sucre analogue, de tels nucléotides modifiés étant décrits par exemple dans la demande PCT N°WO 95/04064.

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est
35 considéré comme étant « complémentaire » d'un second polynucléotide

lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynuléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

Selon l'invention, un premier acide nucléique ayant au moins
5 80% d'identité avec un second acide nucléique de référence, possédera au moins 80%, de préférence au moins 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 99,5% d'identité en nucléotides avec ce second polynuléotide de référence, le pourcentage d'identité entre deux séquences étant déterminé comme décrit ci-dessous.

10 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans
15 la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de
20 positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le
25 résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière préférée, le pourcentage d'identité de séquences est déterminé à l'aide du logiciel BLAST (version BLAST 2.06 de
30 Septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

Un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique selon l'invention englobe les « variants » d'un acide nucléique selon l'invention.

Par « variant » d'un acide nucléique selon l'invention, on entend
35 un acide nucléique qui diffère de l'acide nucléique de référence par une

ou plusieurs substitutions, additions ou délétions d'un nucléotide, par rapport à l'acide nucléique de référence. Un variant d'un acide nucléique selon l'invention peut être d'origine naturelle, tel qu'un variant allélique qui existe naturellement. Un tel acide nucléique variant peut être également un acide nucléique non naturel obtenu, par exemple, par des techniques de mutagenèse.

En général, les différences entre l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique « variant » sont réduites de telle sorte que l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique variant ont des séquences nucléotidiques très similaires et, dans de nombreuses régions, identiques. Les modifications nucléotidiques présentes dans un acide nucléique variant peuvent être silencieuses, ce qui signifie qu'elles n'affectent pas la séquence d'acides aminés qui peut être codée par cet acide nucléique variant.

Les modifications de nucléotides dans l'acide nucléique variant peuvent aussi résulter en des substitutions, additions ou délétions d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence du polypeptide qui peut être codé par cet acide nucléique variant.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention comportant une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la même fonction ou la même activité biologique que le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention et qui comporte une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la capacité d'être reconnu par des anticorps dirigés contre le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

Par « fragment » d'un acide nucléique selon l'invention, on entend une séquence nucléotidique d'une longueur réduite par rapport à l'acide nucléique de référence, le fragment d'acide nucléique possédant une séquence nucléotidique identique à la séquence nucléotidique de l'acide nucléique de référence sur la partie commune. De tels fragments d'un acide nucléique selon l'invention possèdent au moins 12, 15, 18, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000 ou 4000 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de référence, la longueur maximale en nucléotides d'un fragment d'un acide nucléique

WO 02/36788

PCT/FR01/03439

selon l'invention étant bien entendu limitée par la longueur maximale en nucléotides de l'acide nucléique de référence.

ACIDES NUCLEIQUES DU GENE DD1-a

5

Comme indiqué ci-dessus, l'acide nucléique génomique du gène DD1-a est référencé comme la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 du listage de séquences.

En conséquence, la présente invention a pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique.

Fait également partie de l'invention un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique tel que défini ci-dessus.

15

Un autre objet de l'invention est un acide nucléique consistant en un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

20

L'invention est aussi relative à un acide nucléique comprenant au moins 12, de préférence au moins 15 et de manière tout à fait préférée au moins 20 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1, étant entendu qu'un tel acide nucléique englobe dans sa définition des « fragments » d'un acide nucléique selon l'invention tel que défini dans la présente description.

25

La séquence du gène DD1-a telle que décrite dans la séquence SEQ ID N°1 comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement:

a) la séquence régulatrice du gène DD1-a permettant l'expression de la protéine DD1-a dans la zone de transfert du grain en développement;

30

b) une région dite « codante » qui comprend les exons et les introns du gène DD1-a; et

(c) une région non codante localisée en aval de la région codante et susceptible de contenir des éléments de régulation de l'expression du gène DD1-a.

La région régulatrice du gène DD1-a débute au nucléotide en position 1 et se termine au nucléotide en position 3598 de la séquence SEQ ID N°1.

La région non codante localisée en aval de la région codante du gène DD1-a débute au nucléotide en position 6541 et se termine au nucléotide en position 7159 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

La séquence du gène DD1-a comprend aussi cinq exons et quatre introns, dont les caractéristiques structurales sont détaillées respectivement dans les tableaux 1 et 2 ci-après.

TABLEAU 1

Séquences des exons du gène DD1-a

Exon n°	Position du nucléotide en 5' sur la SEQ ID N°1	Position du nucléotide en 3' sur la SEQ ID N°1
1	3582	3778
2	4489	4668
3	4742	4795
4	4875	5012
5	6181	6730

L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide exonique du gène DD1-a, tel que les polynucléotides 1 à 5 décrits dans le tableau 1 ci-dessus, qui sont tous inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1.

Un tel acide nucléique code pour au moins une partie du polypeptide codé par le gène DD1-a et peut notamment être inséré dans un vecteur recombinant destiné à l'expression du produit de traduction correspondant dans une cellule hôte ou dans une plante transformée avec ce vecteur recombinant.

Un tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour la synthèse de sondes et d'amorces nucléotidiques destinées à la détection ou à l'amplification de séquences nucléotidiques comprises dans le gène DD1-a dans un échantillon, le cas échéant de séquences du gène DD1-a portant une ou plusieurs mutations, préférentiellement une ou plusieurs mutations de nature à modifier le phénotype d'une plante portant un tel gène DD1-a muté, par exemple en modifiant la régulation du transfert de métabolites de la plante mère vers l'albumen en formation dans le grain ou encore en modifiant la régulation de la réponse à un stress biotique tel que l'infection par un pathogène des végétaux, ou encore le développement de l'albumen ou de l'embryon.

TABLEAU 2
Séquences des introns du gène DD1-a

Intron n°	Position du nucléotide en 5' sur la SEQ ID N°1	Position du nucléotide en 3' sur la SEQ ID N°1
1	3779	4488
2	4669	4741
3	4796	4874
4	5013	6180

L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide intronique du gène DD1-a, tel que les polynucléotides 1 à 4 décrits dans le tableau 2 ci-dessus, qui sont tous inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1.

Un tel acide nucléique peut être utilisé comme sonde ou amorce oligonucléotidique pour détecter la présence d'au moins une copie du gène DD1-a dans un échantillon, ou encore pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène DD1-a.

La région génomique du gène DD1-a essentiellement restreinte à la région dite « codante » comprenant les 5 exons et les 4 introns est référencée comme la séquence SEQ ID N°5 du listage de séquences.

La séquence SEQ ID N°5 a une longueur de 3149 nucléotides et comprend notamment :

- la séquence de l'exon 1 du gène DD1-a allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 197 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'exon 2 allant du nucléotide en position 908 jusqu'au nucléotide en position 1087 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'exon 3 allant du nucléotide en position 1161 jusqu'au nucléotide en position 1214 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'exon 4 allant du nucléotide en position 1294 jusqu'au nucléotide en position 1431 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'exon 5 allant du nucléotide en position 2600 jusqu'au nucléotide en position 3149 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'intron 1 du gène DD1-a allant du nucléotide en position 198 jusqu'au nucléotide en position 907 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'intron 2 allant du nucléotide en position 1088 jusqu'au nucléotide en position 1160 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'intron 3 allant du nucléotide en position 1215 jusqu'au nucléotide en position 1293 de la séquence SEQ ID N°5;
- la séquence de l'intron 4 allant du nucléotide en position 1432 jusqu'au nucléotide en position 2599 de la séquence SEQ ID N°5.

L'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention concerne aussi un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a également trait à un acide nucléique consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique
5 caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences nucléotidiques suivantes:

- a) la séquence allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 197 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- 10 b) la séquence allant du nucléotide en position 908 jusqu'au nucléotide en position 1087 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- c) la séquence allant du nucléotide en position 1161 jusqu'au nucléotide en position 1214 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide
15 nucléique de séquence complémentaire;
- d) la séquence allant du nucléotide en position 1294 jusqu'au nucléotide en position 1431 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- e) la séquence allant du nucléotide en position 2600 jusqu'au
20 nucléotide en position 3149 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- f) la séquence allant du nucléotide en position 198 jusqu'au nucléotide en position 907 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- 25 g) la séquence allant du nucléotide en position 1088 jusqu'au nucléotide en position 1160 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire; et
- h) la séquence allant du nucléotide en position 1215 jusqu'au nucléotide en position 1293 de la séquence SEQ ID n°5;
- 30 i) la séquence allant du nucléotide en position 1432 jusqu'au nucléotide en position 2599 de la séquence SEQ ID N°5, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°5 est représenté à la figure 1, dans laquelle sont également détaillées les positions des
35 différents exons et introns du gène DD1-a.

Il a été montré selon l'invention que le gène DD1-a est transcrit sous la forme d'un ARN messager qui a été partiellement isolé et caractérisé. Cet ARN messager comporte un cadre de lecture ouvert codant partiellement pour la protéine DD1-a.

- 5 L'ADNc partiel du gène DD1-a a une longueur de 782 nucléotides et est référencé comme la séquence SEQ ID N°7 du listage de séquences.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en
10 nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°7, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention est aussi relative à un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique
15 SEQ ID N°7 ou un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

20 Fait également partie de l'invention un acide nucléique constitué de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le gène DD1-a code pour un polypeptide de 304 acides aminés de longueur possédant un degré d'identité en acides aminés d'environ
25 90% par rapport à la séquence en acides aminés du polypeptide codé par le gène DD1-b selon l'invention, après alignement des deux séquences.

Le polypeptide codé par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°5 du gène DD1-a est référencé comme la séquence
30 SEQ ID N°9 du listage de séquences. Ce polypeptide est aussi codé par l'ADNc résultant de la transcription du gène DD1-a.

En conséquence, l'invention est également relative à un acide nucléique codant pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°9.

L'invention a également trait à un acide nucléique caractérisé en ce qu'il code pour le polypeptide de séquence SEQ ID N°9.

Fait également partie de l'invention un acide nucléique codant pour un « fragment » d'un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec un polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N°9.

L'invention concerne aussi un acide nucléique codant pour un fragment d'un polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N°9.

Un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec un polypeptide de référence comprend au moins 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% au moins 99,5% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de référence.

Sont englobés dans la définition d'un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec un polypeptide de référence selon l'invention, les polypeptides dits « variants ». Par « variants » d'un polypeptide selon l'invention, on entend un polypeptide dont la séquence en acides aminés comprend une ou plusieurs substitutions, additions ou délétions d'au moins un résidu d'acide aminé, par rapport à la séquence d'acides aminés du polypeptide de référence, étant entendu que les substitutions d'acides aminés peuvent être de nature conservative ou non conservative.

Un variant d'un polypeptide de référence selon l'invention consiste en un polypeptide qui conserve la fonction ou l'activité biologique du polypeptide de référence et/ou qui est reconnu par des anticorps dirigés contre le polypeptide de référence. Ces variants polypeptidiques peuvent résulter de variations alléliques caractérisées par des différences dans les séquences nucléotidiques du gène codant pour ces polypeptides. De tels variants polypeptides peuvent aussi résulter d'épissages alternatifs ou de modifications post-traductionnels.

Par « fragment » d'un polypeptide de référence selon l'invention, on entend un polypeptide possédant au moins 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 250 acides aminés consécutifs d'un polypeptide tel que défini dans la présente description.

35 ACIDES NUCLEIQUES DU GENE DD1-b

Comme indiqué précédemment, l'acide nucléique génomique du gène DD1-b selon l'invention, est référencé comme la séquence SEQ ID N°2 du listage de séquences.

5 Ainsi, l'invention concerne aussi un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique.

10 Elle a également trait à un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique défini ci-dessus.

 L'invention est aussi relative à un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique
15 précité.

 La séquence génomique du gène DD1-b selon l'invention de séquence SEQ ID N°2 comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', les séquences suivantes:

 a) la séquence régulatrice du gène DD1-b permettant
20 l'expression spécifique de ce gène dans la zone de transfert du grain en développement;

 b) une région nucléotidique dite « codante » comprenant les quatre exons et les trois introns du gène DD1-b ; et

 c) une région non codante localisée en aval de la région
25 codante ci-dessus, et qui est susceptible de contenir des éléments de régulation additionnels du gène DD1-b.

 L'invention est aussi relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs du polynucléotide de séquence
SEQ ID N°2.

30 La séquence régulatrice du gène DD1-b débute au nucléotide en position n°1 et se termine au nucléotide en position n°2816 de la séquence SEQ ID N°2. Cette séquence régulatrice est référencée comme la séquence SEQ ID N°4 du listage de séquences.

La séquence nucléotidique codante du gène DD1-b qui comprend l'ensemble des exons et des introns de ce gène est référencée comme la séquence SEQ ID N°6 du listage de séquences.

La séquence localisée en aval de la région codante du gène DD1-b débute au nucléotide en position 5459 et se termine au nucléotide en position 6128 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

Comme déjà mentionné, la séquence du gène DD1-b comprend 4 exons et 3 introns, dont les caractéristiques structurales sont détaillées respectivement dans les tableaux 3 et 4 ci-après.

10

TABLEAU 3
Séquences des exons du gène DD1-b

Exon n°	Position du nucléotide en 5' sur la SEQ ID N°2	Position du nucléotide en 3' sur la SEQ ID N°2
1	2800	2996
2	3724	3903
3	4102	4239
4	5099	5658

15 L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide exonique du gène DD1-b, tels que les polynucléotides 1 à 4 décrits dans le tableau 3 ci-dessus, qui sont tous inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2.

20 L'invention concerne aussi un acide nucléique consistant en au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide exonique du gène DD1-b.

Un tel acide nucléique code pour au moins une partie du polypeptide DD1-b et peut notamment être inséré dans un vecteur recombinant destiné à l'expression du produit de traduction correspondant dans une cellule hôte ou dans une plante transformée avec ce vecteur recombinant.

25

Un tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour la synthèse de sondes et d'amorces nucléotidiques destinées à la détection ou à

l'amplification de séquences nucléotidiques comprises dans le gène DD1-b dans un échantillon, le cas échéant de séquences du gène DD1-b portant une ou plusieurs mutations, préférentiellement une ou plusieurs mutations de nature à modifier le génotype d'une plante portant un tel gène DD1-b muté, par exemple en modifiant la régulation du transfert de métabolites de la plante mère vers l'albumen en développement ou encore en modifiant la régulation de la réponse de la plante à un stress biotique tel que l'infection par un pathogène des végétaux.

10

TABLEAU 4
Séquences des introns du gène DD1-b

Exon n°	Position du nucléotide en 5' sur la SEQ ID N°2	Position du nucléotide en 3' sur la SEQ ID N°2
1	2997	3723
2	3904	4101
3	4240	5098

L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide intronique du gène DD1-b, tels que les polynucléotides 1 à 3 décrits dans le tableau 4 ci-dessus, qui sont tous inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2.

Un tel acide nucléique peut être utilisé comme sonde ou amorce oligonucléotidique pour détecter la présence d'au moins une copie du gène DD1-b dans un échantillon, ou encore pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène DD1-b.

La séquence nucléotidique du gène DD1-b essentiellement restreinte à la région « codante » comprenant les quatre exons et les trois introns du gène est référencée comme la séquence SEQ ID N°6 du listage de séquence.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°6, ou avec un fragment de cette

séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention est également relative à un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence
5 nucléotidique SEQ ID N°6, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°6, ou un acide
10 nucléique de séquence complémentaire.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N°6, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°6 comprend notamment
15 les séquences suivantes:

- a) la séquence de l'exon 1 du gène DD1-b allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 197 de la séquence SEQ ID N°6;
- b) la séquence de l'exon 2 allant du nucléotide en position 925
20 jusqu'au nucléotide en position 1104 de la séquence SEQ ID N°6;
- c) la séquence de l'exon 3 allant du nucléotide en position 1303 jusqu'au nucléotide en position 1440 de la séquence SEQ ID N°6;
- d) la séquence de l'exon 4 allant du nucléotide en position 2300 jusqu'au nucléotide en position 2859 de la séquence SEQ ID N°6;
- 25 e) la séquence de l'intron 1 du gène DD1-b allant du nucléotide en position 198 jusqu'au nucléotide en position 924 de la séquence SEQ ID N°6;
- f) la séquence de l'intron 2 allant du nucléotide en position 1105 jusqu'au nucléotide en position 1302 de la séquence SEQ ID N°6; et
- 30 g) la séquence de l'intron 3 allant du nucléotide en position 1441 jusqu'au nucléotide en position 2299 de la séquence SEQ ID N°6.

En conséquence, l'invention a encore pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences nucléotidiques suivantes:

a) la séquence allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 197 de la séquence SEQ ID N°6, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;

5 b) la séquence allant du nucléotide en position 925 jusqu'au nucléotide en position 1104 de la séquence SEQ ID N°6, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;

c) la séquence allant du nucléotide en position 1303 jusqu'au nucléotide en position 1440 de la séquence SEQ ID N°6, ou un acide nucléique de séquence complémentaire; et

10 d) la séquence allant du nucléotide en position 2300 jusqu'au nucléotide en position 2659 de la séquence SEQ ID N°6, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Les séquences nucléotidiques des introns 1, 2 et 3 du gène DD1-b ainsi que leurs acides nucléiques de séquences complémentaire
15 font également partie de l'invention.

Il a été montré selon l'invention que le gène DD1-b est transcrit sous la forme d'un ARN messager qui a été isolé et caractérisé. Cet ARN messager comporte un cadre de lecture ouvert unique codant pour la protéine DD1-b d'une longueur de 286 acides aminés.

20 De part et d'autre du cadre ouvert de lecture, cet ARN messager comprend respectivement une région 5' non traduite (5'-UTR) et une région 3' non traduite (3'-UTR).

L'ADNc correspondant au produit de transcription du gène DD1-b peut être défini comme la séquence SEQ ID N°8 du listage de
25 séquences.

Un ADNc dérivé de l'ARN messager du gène DD1-b de séquence nucléotidique SEQ ID N°8 comprend respectivement:

a) une séquence 5'-UTR allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 14 de la séquence SEQ ID N°8;

30 b) une phase ouverte de lecture allant du nucléotide en position 15, la base A du codon d'initiation de la traduction ATG, jusqu'au nucléotide en position 875, base G du codon TAG d'arrêt de la traduction de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8, et qui correspond à la séquence codante de l'ARN messager du gène DD1-b; et

c) une région 3' UTR allant du nucléotide en position 876 jusqu'au nucléotide en position 1075 de la séquence SEQ ID N°8.

En conséquence, un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°8, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention est aussi relative à un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ou un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention a également trait à un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique allant du nucléotide en position 15 jusqu'au nucléotide en position 875 de la séquence SEQ ID N°8.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec une séquence nucléotidique allant du nucléotide en position 15 jusqu'au nucléotide en position 875 de la séquence SEQ ID N°8.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Fait également partie de l'invention un acide nucléique constitué de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Constitue aussi un objet de l'invention un acide nucléique défini par la séquence allant du nucléotide en position 15 jusqu'au nucléotide en position 875 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Les séquences nucléotidiques génomiques SEQ ID N°2 et SEQ ID N°6 ainsi que l'ADNc de séquence SEQ ID N°8 codent pour un polypeptide du gène DD1-b.

Il a été montré selon l'invention l'existence de variants polypeptidiques codés par le gène DD1-b, selon les souches de maïs desquelles ils proviennent, et qui possèdent entre eux environ 98%

d'identité en acides nucléiques et qui possèdent une longueur de 286 acides aminés.

De tels polypeptides variants n'induisent pas l'expression d'un phénotype particulier, par exemple de déficience dans le transfert de métabolites de la plante mère vers l'albumen en développement dans les plantes considérées. En conséquence, il est permis de considérer que les rares substitutions d'acides aminés rendant compte de différences entre les polypeptides codés par le gène DD1-b selon la plante considérée n'affectent pas la fonction ni l'activité biologique du polypeptide, l'ensemble des substitutions observées dans la séquence en acides aminés de 286 acides aminés de longueur pouvant ainsi définir un ensemble de polypeptides « variants » qui entrent dans la portée de la présente invention.

Les variants polypeptidiques codés par le gène DD1-b diffèrent entre eux exclusivement par une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé.

Ainsi, les produits de traduction du gène DD1-b forment un ensemble de polypeptides fortement homologues, cet ensemble de polypeptides étant défini comme la séquence SEQ ID N°10 du listage de séquences.

L'invention a donc encore pour objet un acide nucléique codant pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°10.

L'invention est également relative à un acide nucléique codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N°10.

Un premier variant polypeptidique particulier codé par le gène DD1-b est référencé comme la séquence SEQ ID N°11 du listage de séquences. Ce premier variant polypeptidique est codé par le génome de la souche de maïs désignée HD5 x HD7.

Un second variant polypeptidique particulier codé par le gène DD1-b est référencé comme la séquence SEQ ID N°12 du listage de séquences. Ce second variant polypeptidique est codé par le génome de la souche de maïs désignée A188.

En conséquence, l'invention a encore pour objet un acide nucléique codant pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°11.

L'invention est aussi relative à un acide nucléique codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N°11.

Fait aussi partie de l'invention un acide nucléique codant pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°12.

Constitue un autre objet de l'invention un acide nucléique codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N°12.

L'invention concerne aussi un acide nucléique codant pour un « fragment » peptidique d'un polypeptide choisi parmi les polypeptides de séquence en acides aminés SEQ ID N°10 à 12.

15 REGION REGULATRICE DES GENES DD1-a et DD1-b

On a montré selon l'invention que les régions régulatrices des gènes DD1-a et DD1-b ont la capacité de diriger l'expression de ces gènes spécifiquement dans les cellules de la zone de transfert du grain en développement. Les propriétés de contrôle d'une expression spécifique de tissu d'un gène d'intérêt qui caractérisent les régions régulatrices des gènes DD1-a et DD1-b, peuvent donc être mises à profit pour diriger l'expression d'acides nucléiques autres que les acides nucléiques contenant les phases de lecture ouvertes respectivement des gènes DD1-a et DD1-b.

Ainsi, les séquences régulatrices des gènes DD1-a et DD1-b, ainsi que des fragments « biologiquement actifs » de ces dernières, peuvent être utilisés pour construire des cassettes d'expression contenant un gène d'intérêt placé sous le contrôle de l'une quelconque de ces séquences régulatrices dans le but d'exprimer spécifiquement ledit gène d'intérêt dans les cellules de la zone de transfert du grain en développement.

La séquence régulatrice du gène DD1-a, qui est comprise dans la séquence SEQ ID N°1, est référencée comme la séquence SEQ ID N°3 du listage de séquences.

La séquence régulatrice du gène DD1-b selon l'invention, qui est comprise dans la séquence SEQ ID N°2, est référencée comme la séquence SEQ ID N°4 du listage de séquences.

5 La figure 5 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 selon l'invention. Sur cette figure, les différents motifs structuraux caractéristiques d'une séquence régulatrice sont indiqués par des boîtes précisant la désignation de chacun des motifs identifiés par le demandeur.

10 La figure 6 représente la séquence SEQ ID N°4 selon l'invention. Sur cette figure, les motifs structuraux caractéristiques d'une séquence régulatrice sont représentés par des boîtes contenant les désignations de chacun des motifs structuraux identifiés par le demandeur.

15 La séquence SEQ ID N°3 comprend une boîte « TATA » localisée du nucléotide en position n°3518 jusqu'au nucléotide en position 3524 de la séquence SEQ ID N°3.

La séquence SEQ ID N°4 comprend une boîte « TATA » localisée du nucléotide en position 2736 jusqu'au nucléotide en position 2742 de la séquence SEQ ID N°4.

20 Le demandeur a également identifié la présence de répétitions directes dans chacune des séquences régulatrices SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, notamment d'une séquence répétée désignée « R6 » de 33 paires de bases présente au nombre de sept copies dans la séquence régulatrice SEQ ID N°3 du gène DD1-a et au nombre de sept copies
25 dans la séquence régulatrice SEQ ID N°4 du gène DD1-b.

La position du nucléotide de départ de chacune des séquences répétées R6 dans les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 sont représentées dans le tableau 5 ci-après.

Tableau 5

répétition	position	séquence
SEQ ID N° 3		
aR6-1	2762	TAACCCAACTAAGCACATCTATCGCAATTATTA
aR6-2	2840	CATTCCAACCTAAGCATATCTCTTGTAGTTAGTA
aR6-3	2928	TATCCCAACTAAGCATACCTCTTACGATTATCA
aR6-4	3219	CATCCCAACTAAGCATATCTCTTACAATTATTA
aR6-5	3296	CATTCCAACCTAAGCAAACCTCTTGGTATTATTA
aR6-6	3401	CAACTAAG TCTTATGATTATT
aR6-7	3466	CATTCCAGCTAAGCATATCTCTTGAATTATTA
SEQ ID N°4		
bR6-1	1841	TAACCCAATTAAGCACATCTCTTGCAATTATTA
bR6-2	1918	CATTCCAACCTAAGCATATCTCTTGTAGTTATTA
bR6-3	2009	TATCCCAACTAAGCATACCAATTACGATTATCA
bR6-4	2418	CCTCCCAACTAAGCATATCTCTTACAATTATTA
bR6-5	2495	CATTCCAACCTAAGCAAATCTCTTGGGAATTATTA
bR6-6	2602	TATCCCAACTAAGCACATCCCTCATGATTATTG
bR6-7	2684	TATTCCAGCTAAGCATATCTTTTACAATTATTA
consensus		
		YatYCCAacTAAGCAnAtCtcTtRnraTTAtta

5

Les séquences régulatrices SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 des gènes DD1-a et DD1-b selon l'invention comprennent quelques motifs constitués de séquences répétées inverses, respectivement des séquences du type « STEM-LOOP » ainsi que des séquences « PALINDROMIQUES ».

Les structures de type « STEM-LOOP » sont représentées dans le tableau 6 ci-après.

Tableau 6

	position	
SEQ ID N°3		
IR1-L	2406	GGTGTTTGAATACACTAGAGCTAATAGTTAGT-45- AACTATTAGCTATTTT
IR1-R	2598	GGGGTGTGAATGCACTCGAGCTAATAGTTAGT-48- AACTATTAACATAATTA
IR1A-L	2424	AGCTAATAGTT-24
IR1A-R	2493	AGCTAATAGTT-24
IR1B-L	2508	AGCTAATAGTTAGTTGGCTA-16
IR1B-R	2580	AGTTAATAGTTAGCTAGCTA-16
IR7-L	3441	TCCTATATAGAAAGATATAAT-22
IR7-R	3526	CTATATATAGCACAATATACT-22
SEQ ID N°4		
IR7-L	2654	CCATATATAGAAAAATATAAT-24
IR7-R	2744	CTATATATAGCACAATATACT-24

5

La région autour de IR1 n'est pas conservée entre les promoteurs DD1-a et DD1-b. La séquence IR1-L est elle-même une structure « stem-loop » composée de IR1A-L et IR1A-R. De même, IR1-R est un « stem-loop » entre IR1B-L et IR1B-R. La structure de type « STEM-LOOP » IR7 contient dans le « loop » la répétition R6 décrite ci-avant. Elle contient dans le « stem » le palindrome IR6 décrit ci-dessous ainsi que la boîte TATA.

Les structures de type « PALINDROMIQUES » de chacune des séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 selon l'invention sont décrites dans le tableau 7 ci-dessous.

15

Tableau 7

	position	DD1-a SEQ ID N°3	position	DD1-b SEQ ID N°4
IR2-L	2394	TAG-ATAGATAGGG	1365	TATGGTAGACATAC
IR2-R	2419	TGT-ATTCAAACAC	1392	TATGGTAAAAATAT
IR3-L	3001	TCTTTCTAT	2081	TCTTTCTAT
IR3-R	3018	TCTTTCTAT	2098	TCTTTCTAT
IR4-L	3165	CGATAT	2364	CTATAT
IR4-R	3176	CTACAT	2375	CTATAT
IR5-L	3435	ATATCTTCCTAT	2648	ATATCTCCATAT
IR5-R	3458	ATATCTTTCTAT	2671	ATATTTTCTAT
IR6-L	3517	CTATA	2735	CTATA
IR6-R	3528	CTATA	2744	CTATA

5

En outre, plusieurs éléments régulateurs *cis* potentiels ont été identifiés dans chacune des séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 à la fois. Ces éléments *cis* sont détaillés respectivement dans les tableaux 8 et 9 ci-dessous.

10

Par une étude d'homologie de séquences avec les données de séquences répertoriées dans la base de donnée PLACE, le demandeur a identifié des éléments structuraux caractéristiques de certaines séquences régulatrices, telles que représentées dans le tableau 8 ci-dessous.

15

Tableau 8

Désignation du motif (nomenclature PLACE)	position DD1-a/ SEQ ID N°3	position DD1-b/ SEQ ID N°4	séquence
BOXIINTPATPB	2819	1897	ATAGAA
	3010	2090	
	3447	2660	
CCAATBOX1	1826	673	CCAAT
DOFCOREZM	1710	565	AAAG
	1738	596	
	2682	1751	
	2823	1901	
	3014	2094	
DPBFCORECDC3	3044	2124	ACANNG
EBOXNNAPA	3562	2780	CANNTG
IBOX	3105	2191	GATAAG
MYBCORE	2663	1732	CNGTTR
POLLEN1LELAT52	2821	1899	AGAAA
	3012	2092	
	3279	2478	
	3449	2662	
	3573	2791	
ROOTMOTIFTAPOX1	1789	646	ATATT
	2883	1961	
	3157	2353	
	3394	2593	
	3509	2727	

5

Le motif BOXIINTPATPB est retrouvé dans de nombreux promoteurs végétaux, y compris dans le promoteur du gène atpB du tabac et différents autres gènes de plastide végétaux, ce motif étant décrit notamment dans l'article de KAPOOR et al. (1999).

Le motif CCAATBOX1 constitue une séquence commune retrouvée dans les régions non codantes localisées du côté 5' de nombreux gènes eukaryotes .

Le motif DOFCOREZM possède un site de reconnaissance pour les protéines Dof de maïs. Les protéines Dof sont des protéines se liant à l'ADN possédant potentiellement un unique motif en doigt de zinc .

15

Le motif DOFCOREZM est décrit notamment par YANAGISAWA et al., (1999).

Le motif DPBFCORECDC3 est une classe particulière de facteur de transcription de type bZIP, retrouvé notamment dans la
5 séquence promotrice du gène Dc3 de la carotte, dont l'expression est spécifique de l'embryon. Le motif DPBFCORECDC3 est notamment décrit par KIM et al. (1997).

Le motif EBOXNAPA est retrouvé dans la séquence régulatrice d'un gène de protéine de stockage de *Brassica napus* et est
10 décrit par exemple par STALBERG et al. (1996).

Le motif IBOX est une séquence conservée retrouvée en amont des gènes régulés par la lumière. Un tel motif a été notamment retrouvé dans la région promotrice du gène rbcS chez la tomate et chez *Arabidopsis*. Le motif IBOX est notamment décrit par GIULIANO et al.
15 (1998) et par DONALD et al. (1990).

Le motif MYBCORE est un site de fixation pour les protéines MYB, ATMYB1 et ATMYB2, toutes isolées chez *Arabidopsis*. La protéine ATMYB2 est impliquée dans la régulation de gènes sensibles à un stress hydrique chez *Arabidopsis*. Une protéine MYB de pétunia, la protéine
20 MYB.Ph3 est impliquée dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes comme décrit par SOLANO et al., (1995).

Le motif MYBCORE est décrit notamment par LUSCHER et al; (1990), par URAO et al. (1993) et par SOLANO et al. (1995).

Le motif POLLEN1LELAT52 constitue l'un des deux éléments
25 régulateurs responsables de l'activation spécifique du pollen chez la tomate du gène lat52. Un tel motif structural est notamment décrit par BATE et al; (1998).

Le motif ROOTMOTIFTAPOX1 est retrouvé à la fois dans les promoteurs du gène rolD et du gène de la peroxydase POX1 spécifique
30 des racines de blé. Un tel motif structural est notamment décrit par ELMAYAN et al. (1995).

Par une étude d'homologie de séquence entre les séquences nucléotidiques SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 selon l'invention d'une part, et d'autre part les séquences répertoriées dans la base de données CARE, le demandeur a identifié des motifs caractéristiques supplémentaires dans les séquences régulatrices des gènes DD1-a et DD1-b, qui sont détaillés dans le tableau 9 ci-après.

Tableau 9

Désignation du motif (nomenclature CARE)	position DD1-a/ SEQ ID N° 3	position DD1-b/ SEQ ID N° 4	séquence
AT~TCT-motif	3237	2436	TCTTAC
GM~CAAT-box	2727	1806	CAATT
	2785	1864	
	3242	2441	
	3489	3207	
OS~TATC-box	2927	2008	TATCCCA
PC~chs-CMA2a	3560	2778	TCACCTGA
ZM~TATA-box	2891	1969	TATATAT
	3347	2546	
	3517	2735	

Les motifs structuraux du tableau 9 ci-dessus sont précisés ci-après.

Le motif AT~TCT constitue une partie d'une séquence d'ADN conservée du gène *gabB* impliqué dans la réponse à la lumière. Un tel motif structural est par exemple décrit par KWON et al. (1994).

Le motif GM~CAAT-box est un élément agissant en *cis* qui est retrouvé communément dans les régions promotrices et activatrices (« enhancer »).

Le motif structural OS~TATC-box est un élément agissant en *cis* impliqué dans la réponse à la gibberelline, qui est décrit notamment par TAKAIWA et al. (1991).

Le motif PC~chs-CMA2a est la partie d'un module d'ADN conservé chs impliqué dans la réponse à la lumière, qui est notamment décrit par HERMANN et al. (1988).

Le motif ZM~TATA-box est l'élément promoteur proprement dit
5 localisé en général à une distance d'environ 30 bases du site d'initiation de la transcription. Un tel motif structural est notamment décrit par SHEEN et al. (1991).

En conséquence, l'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80%
10 d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°3, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention a également pour objet un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence
15 nucléotidique SEQ ID N°3, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention est également relative à un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°3.

20 L'invention a également trait à un acide nucléique constitué de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en
25 nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°4, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

Constitue un autre objet de l'invention un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence
30 nucléotidique SEQ ID N°4, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique précité.

L'invention a également trait à un acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID N°4, ainsi qu'un acide nucléique constitué de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4.

5 L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant un polynucléotide régulateur de l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt chez une plante, ledit polynucléotide régulateur comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique.

10 Par « fragment » d'un acide nucléique de l'une des séquences régulatrices du gène DD1-a ou DD1-b selon l'invention, on entend une séquence nucléotidique d'une longueur en bases inférieure à celle de la séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 et conservant la capacité à diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans une plante.

15 De manière tout à fait préférée, un fragment d'un acide nucléique régulateur selon l'invention consiste en une séquence nucléotidique d'une longueur en bases inférieure à celle de la séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 et conservant la capacité à diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de
20 la zone de transfert du grain en développement.

L'activité biologique d'un fragment d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 régulateur selon l'invention peut être aisément vérifiée par l'homme du métier, notamment à l'aide des constructions de vecteurs et des procédés de transformation de plantes
25 avec ces derniers, tels que décrits dans les exemples de la présente description.

A titre illustratif, un fragment d'un acide nucléique régulateur selon l'invention peut être obtenu par coupure enzymatique de l'un des acides nucléiques décrits ci-dessus, de manière préférée d'un acide
30 nucléique de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, à l'aide d'une exonucléase ou encore d'une endonucléase de restriction.

Notamment, un fragment d'un acide nucléique régulateur selon l'invention peut être obtenu par exemple par délétion d'un ou plusieurs nucléotides du polynucléotide de séquence SEQ ID N°3 OU SEQ ID N°4 à l'aide de la technique à l'exonucléase III, telle que décrite par exemple
5 par AUSUBEL et al. (1989).

Un fragment d'un acide nucléique régulateur selon l'invention a avantageusement une longueur d'au moins 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1200, 1500, 2000 ou 2500 nucléotides, ou encore paires de bases (bp), s'il se présente sous la forme double brin.

10 Pour la mise en oeuvre d'enzymes de restriction aux fins d'obtenir des fragments d'un acide nucléique régulateur selon l'invention, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989).

Un fragment d'un acide nucléique régulateur selon l'invention
15 pourra également être préparé par amplification spécifique du fragment d'intérêt à l'aide d'un couple d'amorces encadrant, respectivement du côté 5' et du côté 3', la séquence d'intérêt, par exemple à l'aide de la méthode PCR, telle que décrite notamment dans les brevets américains n°US 4.683.195, US 4.683.202 et US 4.965.188.

20 Par exemple, l'homme du métier peut obtenir un fragment de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-a de séquence SEQ ID N°3 par amplification de la séquence SEQ ID N°3 à l'aide de la paire d'amorces de séquences respectives SEQ ID N°13 et SEQ ID N°17, ou encore avec la paire d'amorces de séquences respectives SEQ ID N°14
25 et SEQ ID N°17.

L'homme du métier peut obtenir un fragment d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-b de séquence SEQ ID N°4 en mettant en oeuvre une paire d'amorces respectivement de séquences SEQ ID N°15 et SEQ ID N°17 ou encore une paire d'amorces de
30 séquences respectives SEQ ID N°16 et SEQ ID N°17.

Des fragments d'un acide nucléique régulateur de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 selon l'invention comprennent de préférence au moins l'une des boîtes « TATA » référencées pour chacune de ces séquences dans le tableau 9 ci-dessus, et encore plus préférentiellement
5 les trois boîtes « TATA » référencées dans ce tableau.

L'intérêt d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou DD1-b selon l'invention, comprenant la séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, ou encore un fragment de l'une de ces séquences, est d'inclure cet acide nucléique régulateur dans une construction d'ADN, ou cassette
10 d'expression, comprenant également un polynucléotide d'intérêt dont l'expression spécifique est recherchée dans les cellules de la zone de transfert du grain.

L'invention a donc encore pour objet un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle
15 d'un polynucléotide régulateur tel que défini ci-dessus. Un tel acide nucléique peut être appelé « cassette d'expression ».

L'invention concerne encore un acide nucléique comprenant un polynucléotide régulateur tel que défini ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence nucléotidique d'intérêt
20 fonctionnellement associée au polynucléotide régulateur.

De manière générale, la séquence nucléotidique d'intérêt peut être toute séquence codant pour une protéine dont l'expression est recherchée dans une plante ou encore toute séquence codant pour un
25 acide nucléique sens ou un acide nucléique antisens.

Dans un mode de réalisation préféré, la séquence nucléotidique d'intérêt code pour une protéine impliquée dans le transfert de métabolites vers l'albumen en développement d'un grain de plante.

L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation d'un acide
30 nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b tel que défini ci-dessus dans des constructions nucléotidiques destinées à améliorer la

qualité agronomique, alimentaire ou industrielle d'une plante, en contrôlant notamment la taille et/ou le développement de l'albumen du grain.

On peut par exemple rechercher une augmentation de la teneur en lysine et ainsi modifier qualitativement la composition en protéines de l'albumen. On peut aussi rechercher une modification du rapport amylose/amylopectine afin de modifier la qualité de l'amidon stocké dans l'albumen, ou encore une augmentation de la teneur en amidon et augmenter ainsi la taille de l'albumen par rapport à l'embryon.

Par la transformation de plantes avec de telles constructions nucléotidiques, on peut également rechercher une action précoce et spécifique sur le développement des tissus de l'albumen en utilisant, en tant que séquence nucléotidique d'intérêt, une séquence dérivée d'un gène stimulateur (p. ex. hormone telle qu'une cytokinine ou une auxine). L'expression d'une hormone sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou DD1-b chez une plante peut permettre de modifier les processus de cellularisation et, de façon corrélée, le développement de l'albumen (SCOTT et al., 1998).

On peut aussi utiliser des séquences nucléotidiques d'intérêt dérivées de gènes codant pour des transporteurs de nutriments (notamment des sucres) à l'interface plante/albumen, ou encore dérivées de gènes codant pour des inhibiteurs de ces transports, en vue d'une accumulation différentielles de nutriments dans l'albumen.

On peut également utiliser des séquences nucléotidiques d'intérêt codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique, telle que l'hémoglobine ou le Facteur VIII.

Des exemples illustratifs, mais non limitatifs, de séquences nucléotidiques d'intérêt pouvant être placées sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur des gènes DD1-a ou DD1-b selon l'invention sont présentés ci-dessous.

Séquences nucléotidiques d'intérêt placées sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur selon l'invention

a) Métabolisme des sucres

5 De manière générale, la séquence nucléotidique d'intérêt peut coder pour l'une quelconque des enzymes impliquées dans le stockage des sucres dans l'albumen, telles que l'invertase, la saccharose phosphate synthase, la saccharose synthase, l'UDP-glucose pyrophosphorylase, l'ADP-glucose pyrophosphorylase, la "starch
10 branching enzyme" ou la "starch synthase".

La séquence nucléotidique d'intérêt peut aussi coder pour un transporteur de sucrose ou un transporteur d'hexose dans la zone de transfert BETL afin d'améliorer soit le transfert des assimilats soit d'augmenter la teneur en hexose dans l'endosperme ou bien dans la
15 zone de transfert elle-même. Dans ce dernier cas, il peut y avoir un accroissement de l'activité mitotique via une stimulation du cycle cellulaire, notamment parce que les promoteurs DD1-a et DD1-b sont très précoces. Des séquences codant pour des transporteurs de sucres sont par exemple celles codant pour le transporteur symplastique H⁺ de
20 sucrose (AOKI et al., 1999) ou pour divers transporteurs de monosaccharides décrits dans la base de données Est ZmDB (GAI et al., 2000).

La séquence nucléotidique d'intérêt peut aussi coder pour une hexokinase telle que décrite par JANG et al., (1997) afin d'améliorer le
25 remplissage du grain.

L'utilisation de l'invertase (EC 3.2.1.26) permettrait un clivage plus efficace du saccharose en glucose et fructose et serait susceptible d'augmenter la vitesse de transport et aussi de favoriser l'obtention de
30 grains plus gros, puisqu'il est observé que des plantes mutantes pour cette enzyme possède des grains très petits. On peut utiliser une

séquence codant pour une invertase pariétale ou pour une invertase soluble. On peut par exemple utiliser les séquences dérivées des gènes Inc W1 (N° d'accès AF050129 de la base de données GenBank), Inc W2 (N° d'accès AF050128), Inc W3 (N° d'accès AF043346 et AF 043728), Inc W4 (N° d'accès AF 043347), lvr1 (N° d'accès U16123 et AF171874) ou encore celle référencée sous le N° d'accès Y16262.

L'utilisation de la saccharose synthase (E.C. 2.4.1.13) permettrait d'induire une augmentation de la consommation du saccharose dans l'albumen et devrait ainsi diminuer son transport vers l'embryon et réduire la taille de ce dernier et augmenter la taille de l'albumen. On peut par exemple utiliser les séquences dérivées des gènes Sh1 (N° d'accès X02382 et X02400 de la base de données GenBank) ou Sus1 (N° d'accès L33244 et L22296).

b) Protéines du cycle cellulaire

On peut induire une augmentation de la division cellulaire localisée dans la zone de transfert par l'utilisation, en tant que séquence nucléotidique d'intérêt, de certaines cyclines, en particulier la cycline D2 décrite par (COCKROFT et al. , 2000), ou encore la cycline D3, en vue d'obtenir un meilleur remplissage du grain.

c) Protéines de réserve

Afin d'augmenter la teneur en différents acides aminés, tels que la lysine ou encore les acides aminés soufrés comme la cystéine et la méthionine, il serait possible de favoriser le transport (flux) de ces acides aminés ou précurseurs de ces acides aminés vers l'albumen à l'aide de séquences nucléotidiques d'intérêt codant pour des transporteurs ou des perméases d'acides aminés, tels que par exemple les perméases de la lysine (CHEN et BUSCH, 1999) et les perméases de la méthionine

(FISCHER et al., 1998). On peut aussi utiliser une séquence codant pour un transporteur de soufre afin d'augmenter la synthèse d'acides aminés soufrés par les cellules de l'albumen et conduire ainsi à un accroissement de la teneur en ces acides aminés. Des séquences
5 codant pour un transporteur de soufre sont par exemple décrites par HAWKESFORD et al. (2000).

On peut aussi mettre en oeuvre des séquences nucléotidiques d'intérêt codant pour des transporteurs de certains ions ou encore codant pour la ferritine.

10

d) Protéines de défense

La séquence nucléotidique d'intérêt peut aussi coder pour une protéine impliquée dans la résistance aux maladies, telles que les
15 chitinases (demande PCT N°WO 92/01792), les glucanases (demande PCT N°WO 93/02197), l'oxalate oxydase (demande PCT N°WO 94/13790) ou encore les peptides anti-bactériens et/ou antifongiques, en particulier des peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéine comme les thionines ou les défensines de plantes, et plus
20 particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants: l'androctonine (demande PCT N°WO 97/30082 et demande PCT/FR 98/01814 déposée le 18 Août 1998) ou la drosomicine
25 (demande n°PCT/FR 98/01462 déposée le 8 Juillet 1998). La séquence nucléotidique d'intérêt peut aussi coder pour une protéine ou un peptide choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicithines (KAMOUN et al., 1993; PANABIERES et al., 1995).

Une protéine de défense d'intérêt peut également être un
30 peptide antimicrobien du type thionine, défencine, knottine, ou une protéine de transfert lipidique (BROEKAERT et al., 1997). Il peut s'agir

aussi d'un peptide antifongique PAFP-s de *Phytolacca Americana* (FENG-SHAO et al., 1999).

e) Molécule signal/métabolisme des hormones

La séquence nucléotidique d'intérêt peut aussi coder pour une molécule signal telle que le gène IPT de l'isopentenyl transferase (HEIDEKAMP et al., 1983).

On peut aussi utiliser des séquences des gènes rolC et laa en vue de la surexpression d'auxine qui stimule aussi la division cellulaire.

On peut également mettre en oeuvre des séquences codant pour des molécules ligands, telles que la protéine CLAVATA 3 d'*Arabidopsis*.

f) Autres séquences nucléotidiques d'intérêt

On peut utiliser les séquences des gènes Esr (« embryo surrounding region ») décrits par OPSAHL-FERSTAD et al. (1997) qui sont exprimées spécifiquement dans la région entourant l'embryon et dont une régulation (surexpression ou sous-expression) au niveau de la zone des cellules de transfert pourrait influencer sur la taille de l'endosperme ou de son développement.

On peut aussi mettre en oeuvre des séquences mutées ou tronquées des gènes du type polycomb telles que les séquences MEDEA, FIS et FIE (MA, 1999) qui participent au contrôle du développement de l'endosperme avant fécondation et qui interviennent dans la configuration de la chromatine et peuvent ainsi avoir une relation avec le niveau de méthylation de cette dernière. La surexpression de gène du type polycomb muté ou encore l'inhibition de l'expression de tels gènes par des oligonucléotides antisense puissent conduire à un

développement plus important de la zone BETL et donc à un meilleur remplissage.

On peut également utiliser des séquences nucléotidiques d'intérêt codant pour des protéines cytotoxiques telles que la barnase ou la toxine diphtérique afin de détruire spécifiquement un tissu, en l'occurrence la zone de transfert, et d'utiliser les faits sur le développement du grain, notamment sur le développement de l'embryon en l'absence de la zone de transfert.

10 SONDES ET AMORCES SELON L'INVENTION

Les acides nucléiques selon l'invention, et en particulier les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8, leurs fragments d'au moins 12 nucléotides, les séquences ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec au moins une partie des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8, ainsi que les acides nucléiques de séquence complémentaire, sont utiles pour la détection de la présence d'au moins une copie d'une séquence nucléotidique du gène DD1-a ou du gène DD1-b ou encore d'un fragment ou d'un variant allélique de cette dernière dans un échantillon.

Font également partie de l'invention les sondes et amorces nucléotidiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique choisi parmi les séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8.

Par conditions d'hybridation de forte stringence, au sens de l'invention, on entend les conditions d'hybridation suivantes:

Préhybridation:

mêmes conditions que pour l'hybridation
durée: 1 nuit.

Hybridation:

5 x SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM phosphate de sodium pH 7.7, 5 mM EDTA)

5 x Denhardt's (0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.2% SAB)

5 100 µg/ml ADN de sperme de saumon

0.1% SDS

durée: 1 nuit.

Lavages:

2 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C

10 1 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C

0.5 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C

0.1 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C.

Les paramètres définissant les conditions de stringence
15 dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 360 bases, T_m est définie par la relation:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \text{ Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63 (\% \text{ formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

20 (SAMBROOK et al., (1989), pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Dans des conditions de stringence appropriées, dans lesquelles
25 les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en-dessous de T_m .

Les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont
30 l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon les techniques connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985) ou encore dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (1989).

5

Les sondes ou les amorces nucléotidiques selon l'invention comprennent au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier d'un acide nucléique de séquences SEQ ID N°1 à 8 ou de sa séquence complémentaire, d'un acide nucléique ayant 80% d'identité en nucléotide avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 à 8 ou de sa séquence complémentaire ou encore d'un acide nucléique hybridant dans des conditions d'hybridation de forte stringence avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 à 8 ou de sa séquence complémentaire.

15

De préférence, des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention auront une longueur d'au moins 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 3000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention.

20

Alternativement, une sonde ou une amorce nucléotidique selon l'invention consistera et/ou comprendra les fragments d'une longueur de 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 3000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention.

25

Des exemples d'amorces et de couples d'amorces permettant d'amplifier un fragment d'acide nucléique du gène DD1-a ou DD1-b de séquence respective SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 sont par exemple les amorces SEQ ID N°13 à 17 et 20 à 25.

30

Le couple d'amorces SEQ ID N°13 et SEQ ID N°17 permet d'amplifier un fragment d'environ 3 kb contenu dans la séquence régulatrice du gène DD1-a de séquence SEQ ID N°3.

Le couple d'amorces SEQ ID N°14 et SEQ ID N°17 permet d'amplifier un acide nucléique d'environ 1 kb contenu dans la séquence régulatrice du gène DD1-a de séquence SEQ ID N°3.

Le couple d'amorces SEQ ID N°15 et SEQ ID N°17 permet
5 l'amplification d'un acide nucléique d'environ 2,5 kb contenu dans la séquence régulatrice du gène DD1-b de séquence SEQ ID N°4.

Le couple d'amorces de séquences SEQ ID N°16 et SEQ ID N°17 permet l'amplification d'un acide nucléique d'environ 1,6 kb contenu dans la séquence régulatrice du gène DD1-b de séquence SEQ ID N°4.

10 L'utilisation des amorces de séquences SEQ ID N°20 à 25 dans des réactions d'amplification est décrite à l'exemple 1.

Une amorce ou une sonde nucléotidique selon l'invention peut être préparée par toute méthode adaptée bien connue de l'homme du métier, y compris par clonage et action d'enzymes de restriction ou
15 encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de NARANG et al. (1979) ou de BROWN et al. (1979), la méthode au diéthylphosphoramidites de BEAUCAGE et al. (1980) ou encore la technique sur support solide décrite dans le brevet européen n°EP 0 707 592. Chacun des acides nucléiques selon
20 l'invention, y compris les sondes et amorces oligonucléotidiques décrites ci-dessus, peut être marqué, si désiré, en incorporant une molécule détectable, c'est-à-dire un marqueur détectable, par des moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques.

25 Par exemple, de tels marqueurs peuvent consister en des isotopes radioactifs (^{32}P , ^3H , ^{35}S), des molécules fluorescentes (5-bromodéoxyuridine, fluorescéine, acétylamino fluorène, digoxigénine) ou encore des ligands tels que la biotine.

Le marquage des sondes est fait de préférence par
30 incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces, ou bien par rajout sur les extrémités 5' ou 3'.

Des exemples de marquage non radioactif de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet français n°FR 78 10 975 ou encore dans les articles de URDEA et al. (1988) ou SANCHEZ PESCADOR et al. (1988).

5 De manière avantageuse, les sondes selon l'invention peuvent avoir des caractéristiques structurelles de nature à permettre une amplification du signal, telles que les sondes décrites par URDEA et al; (1991) ou encore dans le brevet européen n°EP 0 225 807 (Chiron).

Les sondes oligonucléotidiques selon l'invention peuvent être
10 utilisées notamment dans des hybridations de type Southern à l'ADN génomique du gène DD1-a ou du gène DD1-b ou encore dans des hybridations à l'ARN messenger de l'un quelconque des deux gènes lorsque l'expression du transcrit correspondant est recherchée dans un échantillon.

15 Les sondes selon l'invention peuvent aussi être utilisées pour la détection de produits d'amplification PCR ou encore pour la détection de mésappariements.

Une sonde particulière selon l'invention est par exemple la sonde de séquence SEQ ID N°26 ou encore la sonde de séquence SEQ
20 ID N°29.

Des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être immobilisées sur un support solide. De tels supports solides sont bien connus de l'homme du métier et comprennent des surfaces des puits de plaques de micro-titration, des billes de polystyrène, des
25 billes magnétiques, des bandes de nitrocellulose ou encore des microparticules telles que des particules de latex.

En conséquence, l'invention a encore pour objet un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend au moins 12 nucléotides consécutifs
30 d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, en particulier d'un acide nucléique de séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8.

L'invention est également relative à un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique caractérisé en ce qu'il consiste en un polynucléotide d'au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, de manière tout à fait préférée d'un
5 acide nucléique de séquences choisies parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8.

Un tel acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce est par exemple l'acide nucléique comprenant et/ou consistant dans un acide nucléique choisi parmi les séquences SEQ ID N°13 à SEQ ID
10 N°17.

Comme décrit ci-dessus, un tel acide nucléique peut en outre être caractérisé en ce qu'il est marqué par une molécule détectable.

Un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique pour la détection ou l'amplification d'une séquence
15 génomique, de l'ARNm ou de l'ADNc du gène DD1-a peut en outre être caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences suivantes:

- a) les séquences nucléotidiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1; et
- 20 b) les séquences comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1.

Selon un autre aspect, un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique pour la détection ou l'amplification d'une séquence génomique, de l'ARNm ou de l'ADNc du gène DD1-b, peut
25 être caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences suivantes:

- a) les séquences nucléotidiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2; et
- b) les séquences comprenant au moins 12 nucléotides
30 consécutifs d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2.

La présente invention concerne également un procédé de détection de la présence d'un acide nucléique du gène DD1-a ou DD1-b dans un échantillon, ladite méthode comprenant les étapes de:

1) mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes
5 nucléotidiques selon l'invention avec l'échantillon à tester;

2) détecter le complexe éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de détection selon l'invention, la ou les sondes oligonucléotidiques sont
10 immobilisées sur un support.

Selon un autre aspect, les sondes oligonucléotidiques comprennent un marqueur détectable.

L'invention concerne en outre un nécessaire ou kit pour la détection de la présence d'un acide nucléique selon l'invention dans un
15 échantillon, ledit nécessaire comprenant:

a) une ou plusieurs sondes nucléotidiques telles que décrites ci-dessus ;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'hybridation.

20 Selon un premier aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que la ou les sondes sont immobilisées sur un support.

Selon un second aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que les sondes oligonucléotidiques comprennent un marqueur détectable.

25 Selon un mode de réalisation particulier du kit de détection décrit ci-dessus, un tel kit comprendra une pluralité de sondes oligonucléotidiques conformes à l'invention qui vont être utilisées pour détecter des séquences cibles d'intérêt du gène DD1-a ou du gène DD1-b ou alternativement détecter des mutations dans les régions codantes
30 ou les régions non codantes du gène DD1-a ou DD1-b, plus

particulièrement des acides nucléiques de séquence SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8 ou les acides nucléiques de séquence complémentaire.

On entend par « séquence cible » au sens de l'invention, une séquence nucléotidique comprise dans un acide nucléique; ladite
5 séquence nucléotidique hybridant, dans les conditions d'hybridation spécifiées dans la description, avec une sonde ou une amorce nucléotidique de l'invention.

Une séquence cible peut être par exemple une séquence comprise dans un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou DD1-b
10 ou encore une séquence comprise dans une région codante génomique ou de l'ADNc de l'un ou l'autre de ces gènes ou encore une séquence commune aux gènes DD1-a ou DD1-b.

Les amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour amplifier un fragment nucléotidique quelconque (ADNg,
15 ADNc, ARNm) du gène DD1-a ou du gène DD1-b, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8, ou encore un fragment ou un variant de ces séquences.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé pour
20 l'amplification d'un acide nucléique selon l'invention, et plus particulièrement d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 à SEQ ID N°8 ou un fragment ou un variant allélique de celui-ci contenu dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de :

- a) mettre en contact l'échantillon dans lequel la présence de
25 l'acide nucléique cible est suspectée avec une paire d'amorces nucléotidiques dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et du côté 3' de la région de l'acide nucléique cible du gène DD1-a ou du gène DD1-b dont l'amplification est recherchée, en présence des réactifs nécessaires à la réaction d'amplification; et
- 30 b) détection de l'acide nucléique éventuellement amplifié.

Pour mettre en oeuvre le procédé d'amplification tel que défini ci-dessus, on aura avantageusement recours à l'une quelconque des amorces nucléotidiques décrites ci-après.

L'invention a en outre pour objet un nécessaire ou kit pour
5 l'amplification d'un acide nucléique selon l'invention, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquences SEQ ID N°1 à 8, ledit nécessaire ou kit comprenant:

a) un couple d'amorces nucléotidiques conforme à l'invention, dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et
10 du côté 3' de l'acide nucléique cible du gène DD1-a ou du gène DD1-b dont l'amplification est recherchée;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'amplification.

Un tel nécessaire ou kit d'amplification comprendra
15 avantageusement au moins une paire d'amorces nucléotidiques telle que décrite ci-dessus.

Selon un mode de réalisation préféré, des amorces selon l'invention comprennent tout ou partie d'un polynucléotide choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°13 à SEQ ID N° 17.

20

VECTEURS RECOMBINANTS SELON L'INVENTION

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne des vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant l'un quelconque
25 des acides nucléiques définis ci-dessus.

VECTEURS RECOMBINANTS COMPRENANT UN ACIDE NUCLEIQUE REGULATEUR DU GENE DD1-a OU DU GENE DD1-b.

30 Un autre objet de l'invention consiste en des vecteurs recombinants dans lesquels a été insérée une séquence régulatrice du

gène DD1-a ou du gène DD1-b ou encore un fragment d'une telle séquence régulatrice, telle que les fragments définis dans la présente description.

Avantageusement, un vecteur recombinant selon l'invention
5 pourra comprendre un acide nucléique régulateur de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 ou encore un fragment de la séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 capable de diriger l'expression d'un gène d'intérêt placé sous son contrôle dans les cellules d'une plante, et de manière tout à fait
10 préférée dans les cellules de la zone de transfert d'un grain en développement.

Font ainsi partie de l'invention des vecteurs recombinants pour l'expression d'un polynucléotide d'intérêt dans la zone de transfert d'un grain de végétal en développement comprenant:

- a) un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène
15 DD1-b tel que défini dans la présente description; et
- b) un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle de l'acide nucléique régulateur défini en a).

Préférentiellement, le polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle de l'acide régulateur du gène DD1-a ou DD1-b est un acide
20 nucléique codant pour une protéine impliquée dans le transfert de métabolites vers l'albumen en développement d'un grain de plante.

Les polynucléotides d'intérêt préférés ont été décrits précédemment dans la description.

Le polynucléotide d'intérêt peut consister en un polynucléotide
25 codant pour un polypeptide détectable, ou polypeptide marqueur tel par exemple un polynucléotide codant pour la protéine GUS ou encore pour une protéine fluorescente, telle que la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ou YFP (Yellow Fluorescent Protein).

Un vecteur qui peut être mis en oeuvre pour l'introduction d'un
30 acide nucléique régulateur selon l'invention capable de contrôler un polynucléotide d'intérêt est le plasmide L127a5 représenté à la figure 7;

Des vecteurs recombinants dans lesquels ont été introduits un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b selon l'invention localisés en amont d'un polynucléotide d'intérêt sont par exemple le vecteur recombinant L246a représenté à la figure 8, le vecteur L246b représenté à la figure 9, le vecteur L247a représenté à la figure 10 et le vecteur L247b représenté à la figure 11.

Le vecteur L246a comprend un acide nucléique d'environ 3 kb de la séquence régulatrice du gène DD1-a localisé en amont du gène rapporteur GUS. Le vecteur L246a est contenu dans la souche de *Escherichia coli* déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le n° d'accès I-2567.

Le vecteur recombinant L246b comprend un acide nucléique régulateur d'environ 1 kb du gène DD1-a, plus précisément un acide nucléique allant du nucléotide en position 2585 jusqu'au nucléotide en position 3595 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3.

Le vecteur L 247a contient un acide nucléique régulateur d'environ 2,5 kb du gène DD1-b. Le vecteur L247a est contenu dans la souche de *Escherichia coli* déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le n° d'accès I-2568.

Le vecteur L247b comprend un acide nucléique régulateur d'environ 1,6 kb de la séquence du gène DD1-b, plus précisément un acide nucléique régulateur allant du nucléotide en position 1204 au nucléotide en position 2813 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4.

L'invention a encore pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs L246a, L246b, L247a et L247b. Pour l'ensemble des vecteurs L246a, L246b, L247a et L247b, l'acide nucléique régulateur du gène DD1-a et du gène DD1-b est localisé en amont du gène marqueur GUS, dont il contrôle l'expression.

VECTEURS RECOMBINANTS CONTENANT UN ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR UN POLYPEPTIDE SELON L'INVENTION.

Un autre objet de l'invention, consiste en un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression contenant une séquence codante du gène DD1-a ou du gène DD1-b, placé sous le contrôle d'une
5 séquence régulatrice appropriée fonctionnelle dans l'organisme hôte dans lequel l'expression d'un polypeptide selon l'invention est recherchée.

Il a été montré selon l'invention qu'un polypeptide codé par le gène DD1-a ou le gène DD1-b est exprimé spécifiquement dans les
10 cellules de la zone de transfert du grain en développement et est ainsi susceptible d'être impliqué dans le transfert des métabolites de la plante mère vers l'albumen, ou encore d'être impliqué dans la défense de la plante envers divers pathogènes végétaux, de constituer un signal pour le développement de l'albumen et/ou de l'embryon comme c'est le cas
15 des gènes codant pour les protéines BETL1 à BETL4 décrits par HUEROS et al. (1999b).

Ainsi, l'invention a encore pour objet un vecteur d'expression recombinant comprenant:

a) un acide nucléique régulateur de l'expression d'un
20 polynucléotide d'intérêt dans un organisme hôte déterminé; et

b) un polynucléotide d'intérêt codant pour un polypeptide selon l'invention, préférentiellement un acide nucléique de séquences SEQ ID N°1, 2, 5, 6, 7 ou 8.

Afin d'améliorer la qualité ou la quantité des métabolites
25 présents dans l'albumen du grain mature, ou encore d'augmenter la résistance d'une plante à divers pathogènes végétaux, il est donc utile de surexprimer un acide nucléique codant pour un polypeptide codé par le gène DD1-a ou par le gène DD1-b.

Le cas échéant, la séquence régulatrice capable de contrôler
30 l'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention peut être une séquence régulatrice inductible par un métabolite particulier, tel que:

- une séquence régulatrice inductible par les glucocorticoïdes telle que décrite par AOYMA et al. (1997) ou telle que décrit par McNELLYS et al. (1998);

5 - une séquence régulatrice inductible par l'éthanol, telle que celle décrite par SALTER et al. (1998) ou encore telle que décrite par KADDICK et al. (1998);

- une séquence régulatrice inductible par la tétracycline telle que celle commercialisée par la Société CLONTECH.

10 La séquence régulatrice capable de contrôler l'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention peut comprendre un promoteur constitutif, tel que:

- le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de KAY
15 ET AL. (1987);

- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-LAR) contenu dans le plasmide pAct-1-F4 décrit par McELROY et al. (1991);

20 - le promoteur pUbl1 du gène codant pour l'ubiquitine 1 de maïs (CHRISTENSEN et al., (1992).

La séquence régulatrice capable de contrôler l'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention peut aussi diriger une expression de l'acide nucléique d'intérêt spécifiquement dans certains
25 tissus, comme la graine, la feuille ou la racine. Il peut s'agir notamment des séquences régulatrices suivantes:

- un promoteur tissu spécifique comme le promoteur HMWG de blé ou d'orge, ou encore le promoteur pCRU du gène de la cruciférine de radis, qui permettent tous trois une expression de la protéine d'intérêt
30 dans les graines (ROBERTS et al. (1989) ; ANDERSON O.D. et al. (1989); DEPIGNY-THIS et al. (1992);

- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6 respectivement d'*Arabidopsis thaliana* (GAUBIER et al., (1993) et permettant une expression spécifique dans les graines;
- 5 - le promoteur du gène de zéine de maïs (Pzéine) contenu dans le plasmide p63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs (REINA et al., 1990);
- des promoteurs spécifiques de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs
10 spécifiques des graines (DATLA, R. et al., 1997), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héllantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460), de l'oélosine (WO 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (PCT/US 98/06978, déposée le 20 Octobre 1998, incorporée ici par référence);
- 15 - promoteurs spécifiques des tissus feuilles ou racines.

caractéristiques générales des vecteurs recombinants selon l'invention.

20 Par « vecteur » au sens de la présente invention, on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme simple brin ou double brin.

Un vecteur recombinant selon l'invention est indifféremment un vecteur de clonage, un vecteur d'expression, ou plus spécifiquement un
25 vecteur d'insertion, un vecteur de transformation ou un vecteur d'intégration.

Il peut s'agir d'un vecteur d'origine bactérienne ou virale.

Selon un premier mode de réalisation, un vecteur recombinant selon l'invention est utilisé afin d'amplifier l'acide nucléique qui y est
30 inséré après transformation ou transfection de l'hôte cellulaire désiré.

Selon un second mode de réalisation, il s'agit de vecteur d'expression comprenant :

a) soit un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b tel que défini ci-dessus placé à proximité d'un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle de cet acide nucléique régulateur;

b) soit un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention codé par le gène DD1-a ou le gène DD1-b, ou encore pour un fragment d'un tel polypeptide, ledit polynucléotide étant placé sous le contrôle d'une séquence régulatrice fonctionnelle dans l'organisme hôte dans lequel l'expression de l'acide nucléique codant pour un peptide selon l'invention est recherchée.

Un vecteur recombinant selon l'invention comprend avantageusement aussi des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriée.

En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de répllication fonctionnelle chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, ainsi que des séquences nucléotidiques marqueurs de sélection.

Selon un aspect avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention est un vecteur intégratif permettant l'insertion de multiples copies de la séquence d'ADN insérée dans ce vecteur dans le génome d'une plante, dont la transformation par un acide nucléique selon l'invention est recherchée.

A titre d'exemples de promoteurs utilisables dans un vecteur recombinant selon l'invention, on peut citer notamment les promoteurs bactériens tels que les promoteurs LacI, LacZ, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, ou encore les promoteurs PR ou PL du phage lambda.

Des promoteurs pour l'expression d'un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention dans les plantes sont par exemple

le promoteur CaMV 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, Mc ELROY et al. (1991), le promoteur du gène de l'actine 1 du riz (Mc ELROY et al., (1990) ou encore le promoteur du gène AdH du maïs (DENNIS et al., 1984) ou le promoteur de l'ubiquitine du maïs (CHRISTENSEN et al., 1996).

On peut aussi utiliser des promoteurs chimériques comprenant des séquences activatrices (« enhancer »), tels que le promoteur 35S décrit par HIGGINS et al. (1991).

D'autres promoteurs utiles pour l'expression d'un polynucléotide d'intérêt dans les plantes sont décrits notamment dans les brevets n°US 5,750,866 et US 5,633,363, l'ensemble des documents et articles précités constituant des références sur lesquelles l'homme du métier pourra se fonder pour construire des vecteurs recombinants selon l'invention.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989) ou encore aux techniques décrites par FULLER et al. (1996).

De manière avantageuse, la cassette d'expression peut aussi contenir des séquences 5' non traduites dites « leaders ». De telles séquences peuvent augmenter la traduction. Parmi celles connues de l'homme du métier, on peut citer:

- le leader EMCV (EncephaloMyoCarditis VIRUS 5' non coding region) (ELROY-STEIN et al., 1989);
- le leader TEV (Tobacco Etch Virus) (CARRINGTON AND FREED, 1990);
- le leader du gène BiP codant pour la protéine de liaison à la chaîne lourde de l'immunoglobuline humaine (MACEJACK et al., 1991);
- le leader AMV RNA 4 provenant de l'ARNm de la protéine du virus de la mosaïque de la luzerne (JOBLING et al. 1987);

- le leader du virus de la mosaïque du tabac (GALLIE et al., 1989).

Les vecteurs selon l'invention peuvent aussi comprendre des séquences dites « terminateurs ».

5 Parmi les terminateurs utilisables dans les constructions de l'invention, on peut citer notamment:

- le polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de FRANCK et al. (1980);

10 - le terminateur nos correspondant à la région 3' non-codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (DEPICKER et al., 1992),

- le terminateur du gène histone (EP 0 633 317).

15 Le vecteur d'expression peut aussi comprendre des séquences de type peptides signaux vacuolaire ou apoplastique lorsqu'elles ne sont pas déjà présentes dans la séquence du gène d'intérêt, pour amener la protéine codée par le gène hétérologue dans des compartiments particuliers des cellules de plante, en particulier celles comprenant la zone de transfert de l'endosperme.

20 Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322 (ATCC n°37 017) ou encore les vecteurs tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, Etats-Unis).

25 On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Quiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pMH16A, pMH18A, pMH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI et pSG (Stratagene).

30 Il peut s'agir également de vecteurs du type *Baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharmingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivée de *Spodoptera frugiperda*.

Préférentiellement, on aura recours à des vecteurs spécialement adaptés pour l'expression de séquence d'intérêt dans des cellules de plantes, tels que les vecteurs suivants:

- vecteur pBIN19 (BEVAN et al.), commercialisé par la Société
5 CLONTECH (Palo Alto, Californie, USA);
- vecteur pB1 101 (JEFFERSON, 1987), commercialisé par la Société CLONTECH;
- vecteur pBI121 (JEFFERSON, 1987), commercialisé par la Société CLONTECH;
- 10 - vecteur pEGFP; Yang et al. (1996), commercialisé par la Société CLONTECH;
- vecteur pCAMBIA 1302 (HAJDUKIEWICZ et al., 1994)
- vecteur L127a5 représenté à la figure 7.

15 CELLULES HOTES TRANSFORMEES SELON L'INVENTION.

Pour permettre l'expression d'un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b selon l'invention ou encore pour permettre l'expression d'un acide
20 nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention placé sous le contrôle d'une séquence régulatrice appropriée, les acides nucléiques ou les vecteurs recombinants définis dans la présente description doivent être introduits dans une cellule hôte. L'introduction des polynucléotides selon l'invention dans une cellule hôte peut être réalisée *in vitro*, selon
25 les techniques bien connues de l'homme du métier pour transformer ou transfecter des cellules, soit en culture primaire, soit sous la forme de lignée cellulaire.

L'invention a en outre pour objet une cellule hôte transformée par un acide nucléique selon l'invention ou par un vecteur recombinant
30 tel que défini ci-dessus.

Une telle cellule hôte transformée est préférentiellement d'origine bactérienne, fongique ou végétale.

Ainsi, peuvent être notamment utilisées des cellules bactériennes de différentes souches de *Escherichia coli* ou encore
5 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

De manière préférée, la cellule hôte transformée est une cellule de plante ou encore un protoplaste de plante.

De manière tout à fait préférée, il s'agit d'une cellule ou d'un protoplaste d'une plante céréalière. La cellule ou le protoplaste est
10 préférentiellement originaire du maïs, du blé, de l'orge, du sorgho ou du millet.

Cellules hôtes contenant un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène
15 **DD1-b.**

Une cellule hôte transformée préférée selon l'invention est la souche de *Escherichia coli* DH5 α contenant le plasmide L246a déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le numéro d'accès I-2567.

20 Une seconde cellule hôte transformée selon l'invention est la souche de *Escherichia coli* DH5 α contenant le plasmide L247a déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le numéro d'accès I-2568.

D'autres cellules hôtes transformées préférées selon l'invention sont respectivement des cellules hôtes transformées avec le plasmide
25 L246b ou le plasmide L247b représentés respectivement dans les figures 9 et 11.

PLANTES TRANSFORMÉES SELON L'INVENTION.

30 L'invention concerne aussi un organisme multicellulaire végétal transformé, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule hôte

transformée ou une pluralité de cellules hôtes transformées par un acide nucléique tel que défini dans la présente description ou encore par un vecteur recombinant selon l'invention.

L'invention a encore pour objet une plante transgénique...
5 comprenant, sous une forme intégrée dans son génome, un acide nucléique tel que défini dans la présente description.

De manière générale, l'invention est aussi relative à l'utilisation d'un acide nucléique tel que défini dans la présente description pour l'obtention de plantes transformées (transgéniques) à qualité
10 agronomique, alimentaire ou industrielle améliorée, par exemple en contrôlant la taille et/ou le développement de l'albumen du grain.

**Plante transformée par un acide nucléique comprenant un
polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide nucléique
15 régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b.**

L'un des objectifs poursuivis selon la présente invention est l'obtention de plantes transgéniques dont le grain mature possède des caractéristiques améliorées, notamment du point de vue de la qualité ou
20 de la quantité des nutriments contenus dans son albumen.

L'invention vise donc également des procédés pour modifier les qualités agronomiques et/ou nutritionnelles d'une plante, par une action ciblée et précoce sur le développement de l'albumen, utilisant la transformation des plantes avec un vecteur selon l'invention. En
25 particulier, elle s'intéresse à la modification de la taille et/ou du développement de l'albumen.

L'invention a plus précisément pour objet l'utilisation d'une cassette d'expression telle que définie précédemment, pour l'obtention d'une plante Angiosperme transgénique présentant des qualités
30 agronomiques ou nutritionnelles améliorées.

L'invention concerne également l'utilisation des plantes transgéniques obtenues selon l'invention, ou parties de ces plantes, notamment semences, grains et fruits pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

5 L'invention permet d'atteindre cet objectif au travers de l'obtention de plantes transgéniques dont le transgène caractéristique est constitué d'un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b selon l'invention, tel que décrit en détail dans la partie correspondante de la présente
10 description.

Un tel acide nucléique régulateur comprend préférentiellement un acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, ou un fragment fonctionnel d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, capable de diriger l'expression du polynucléotide d'intérêt
15 dans la plante, plus particulièrement de diriger l'expression du polynucléotide d'intérêt dans les cellules de la zone de transfert du grain en développement.

De préférence, le polynucléotide d'intérêt, placé sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b, et
20 constituant le transgène d'une plante transformée selon l'invention code pour une protéine impliquée dans le transfert de métabolites vers l'albumen en développement d'un grain de plante.

Les polynucléotides d'intérêt sont ceux décrits précédemment dans la description.

25 Parmi les plantes susceptibles d'être transformées selon l'invention, on peut citer à titre d'exemples des cellules de plantes de grandes cultures (maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge) ou des plantes potagères et fleurs.

En particulier, on peut choisir des plantes connues pour contenir
30 d'importantes réserves (protéiques, glucidiques et lipidiques), notamment les plantes céréalières ou les plantes oléagineuses.

Les plantes hybrides obtenues par le croisement de plantes selon l'invention, font aussi partie de l'invention.

Préférentiellement, une plante transformée selon l'invention est une céréale et de manière tout à fait préférée un maïs, un blé, une orge,
5 un sorgho ou un millet.

L'invention a encore pour objet une semence ou un grain de plante dont une ou plusieurs cellules constitutives comprennent dans leur génome une ou plusieurs copies d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus.

10 Selon un autre aspect, l'invention concerne aussi une semence d'une plante transgénique telle que définie ci-dessus, ou encore un fruit d'une telle plante transgénique.

Les semences ou grains matures d'une plante transgénique telle que définie ci-avant possèdent des caractéristiques qualitatives ou
15 quantitatives en nutriments améliorées, pouvant se caractériser par exemple par une plus forte teneur en divers sucres et amidons.

Plantes transformées par un acide nucléique codant pour un polypeptide du gène DD1-a ou du gène DD1-b.

20

L'invention a également pour objet un organisme multi-cellulaire végétal transformé par un acide nucléique codant pour un polypeptide codé par le gène DD1-a ou par le gène DD1-b.

Préférentiellement, l'acide nucléique codant pour un polypeptide
25 selon l'invention est placé sous le contrôle d'éléments de régulation fonctionnels chez la plante dans laquelle son expression est recherchée.

L'invention a également trait à une plante transformée par un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention ou encore par un vecteur recombinant contenant, insérée dans celui-ci, une
30 séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'invention.

De manière préférée, l'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention est choisi parmi l'acide nucléique de séquences SEQ ID N°1, 2, 5, 6, 7 et 8.

De manière préférée, l'organisme multicellulaire végétal ou la
5 plante transformée par un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention est une céréale, et de manière tout à fait préférée un maïs, un blé, une orge, un sorgho ou un millet.

Outre son rôle potentiel dans le transfert de métabolites de la plante mère vers l'albumen en formation, un polypeptide selon l'invention
10 possède, comme il sera décrit ci-dessous dans la description, des propriétés d'hydrophilicité caractéristiques de polypeptides de type « défensine », ce qui pourrait permettre d'attribuer aux polypeptides codés par les gènes DD1-a et DD1-b selon l'invention un rôle actif dans la défense de la plante vis-à-vis de divers pathogènes végétaux.

15 Ainsi, une plante transformée par un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention pourrait posséder des caractéristiques de résistance améliorées à divers pathogènes de plantes.

L'invention est également relative à un procédé d'obtention
20 d'une plante transgénique telle que définie dans la présente section, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) obtention d'une cellule hôte recombinante végétale selon l'invention;

b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte
25 recombinante obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré un acide nucléique tel que défini dans la présente description.

La cellule hôte recombinante végétale est:

- soit une cellule hôte recombinante transformée par un acide
30 nucléique comprenant un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide nucléique régulateur tel que défini dans la description;

- soit une cellule hôte recombinante transformée avec un acide nucléique comprenant un polynucléotide codant pour un polypeptide selon l'invention, placé sous le contrôle d'une séquence régulatrice fonctionnelle chez les végétaux.

5 L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique, transformée avec un acide nucléique selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée avec un acide nucléique selon l'invention;

10 b) transformation d'une plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes ayant intégré dans leur génome un acide nucléique selon l'invention.

15 L'invention a également trait à un procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisée en ce qu'il comporte les étapes suivantes:

a) transfecter une cellule de plante avec un acide nucléique selon l'invention ou avec un vecteur recombinant tel que défini dans la présente description;

20 b) régénérer une plante entière à partir des cellules de plantes recombinantes obtenues à l'étape a);

c) sélectionner des plantes ayant intégré dans leur génome un acide nucléique selon l'invention.

25 L'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transformée décrits ci-dessus peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes:

d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telle qu'obtenue à l'étape c);

e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

Dans un second mode de réalisation particulier, l'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transgénique décrit ci-dessus peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes:

5 f) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce;

g) sélection des plantes issues du croisement de l'étape f) ayant conservé le transgène.

Un autre objet de l'invention consiste en une plante transgénique, telle qu'obtenue selon l'un quelconque des procédés
10 d'obtention d'une plante transformée définie ci-avant.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une plante Angiosperme présentant des qualités agronomiques ou nutritionnelles améliorées, comprenant les étapes consistant à :

15 transformer au moins une cellule de plante Angiosperme par un vecteur tel que défini précédemment;

cultiver la cellule ainsi transformée de manière à générer une plante contenant dans son génome une cassette d'expression selon l'invention.

20 La transformation de cellules végétales peut être réalisée par les techniques connues de l'homme du métier.

On peut citer notamment les méthodes de transfert direct de gènes telles que la microinjection directe dans des embryoides de plante (NEUHAUS et al., 1987), l'infiltration sous vide (BECHTOLD et al., 1993) ou l'électroporation (CHUPEAU et al., 1989) ou encore la précipitation
25 directe au moyen de PEG (SCHOCHER et al., 1986) ou le bombardement par canon de particules recouvertes de l'ADN plasmidique d'intérêt (FROMM M. et al. 1990).

On peut également infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium*. Selon un mode de réalisation
30 du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible

d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences nucléotidiques d'intérêt initialement contenues dans l'ADN du vecteur susmentionné. Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est
5 *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'AN et al., (1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de GUERCHE et al., (1987) ou encore dans la demande PCT N°WO OO 22.148.

Par exemple, la transformation des cellules végétales peut être
10 réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (WATSON et al. 1994). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans l'un de ces vecteurs, la région T a été éliminée par délétion, à l'exception des bordures droite et gauche, un
15 gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus de région T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale.

20 Selon un mode préféré, on peut utiliser la méthode décrite par ISHIDA et al. (1996) pour la transformation des Monocotylédones.

Selon un autre protocole, la transformation est réalisée selon la méthode décrite par FINER et al. (1992) utilisant le canon à particules de tungstène ou d'or.

25 L'homme du métier est capable de mettre en oeuvre de nombreux procédés de l'état de la technique afin d'obtenir des plantes transformées par un acide nucléique du gène DD1-a ou du gène DD1-b selon l'invention.

L'homme du métier pourra se référer avantageusement à la
30 technique décrite par BECHTOLD et al. (1993) afin de transformer une plante à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Des techniques

utilisant d'autres types de vecteurs peuvent également être utilisées, telles que les techniques décrites par BOUCHEZ et al. (1993) ou encore par HORSCH et al. (1994).

A titre illustratif, une plante transgénique selon l'invention peut
5 être obtenue par des techniques de biolistique telles que celles décrites par FINER et al. (1992) ou encore celles décrites par VAIN et al. (1993).

D'autres techniques préférées de transformation d'une plante conformément à l'invention par *Agrobacterium tumefaciens* sont celles décrites par ISHIDA et al. (1996) ou encore dans la demande PCT
10 publiée sous le n°WO 95/06 722 au nom de JAPAN TOBACCO.

L'invention a encore pour objet une semence de plante dont les cellules constitutives comprennent un acide nucléique selon l'invention qui a été artificiellement inséré dans leur génome.

L'invention a encore pour objet une semence d'une plante
15 transgénique telle que définie ci-avant ou encore un fruit d'une telle plante transgénique.

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un acide nucléique régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b tel que défini dans la présente description pour l'expression *in vitro* ou *in vivo*, de
20 préférence *in planta*, d'un polynucléotide d'intérêt, préférentiellement un polynucléotide codant pour une protéine impliquée dans le transfert de métabolites vers l'albumen en formation d'un grain de plante.

Selon un autre aspect, l'invention concerne encore l'utilisation d'un acide nucléique codant pour un polypeptide codé par le gène DD1-a
25 ou par le gène DD1-b selon l'invention pour l'expression *in vivo* ou *in vitro*, de préférence *in planta*, d'un polypeptide selon l'invention ou encore d'un fragment d'un tel polypeptide.

De manière tout à fait préférée, l'utilisation ci-dessus est caractérisée en ce qu'il s'agit d'une expression *in vivo* chez une plante
30 transformée avec un tel acide nucléique.

POLYPEPTIDES CODES PAR LE GÈNE DD1-a ET LE GÈNE DD1-b

Comme déjà décrit précédemment, le gène DD1-a et le gène DD1-b selon l'invention codent respectivement pour des polypeptides possédant une longueur de 304 et 286 acides aminés, pour lesquels il a pu être observé des polypeptides variants.

Toutefois, le degré d'identité entre les séquences d'acides aminés des polypeptides codés respectivement par le gène DD1-a et le gène DD1-b est très élevé, proche de 90% d'identité en acides aminés, après alignement des séquences.

Les polypeptides codés par le gène DD1-a ou le gène DD1-b possèdent un peptide signal putatif, ce qui est une caractéristique d'une protéine sécrétée.

Le caractère hydrophile de la protéine mature est compatible avec une fonction dans le milieu extracellulaire.

De plus, la même combinaison peptide signal putatif/protéine mature hydrophile des polypeptides selon l'invention est commune avec d'autres polypeptides retrouvés principalement exprimés au niveau des cellules de la zone de transfert du maïs, tels que les polypeptides BETL-1 à BETL-4 décrits par HUEROS et al. (1999).

Le polypeptide codé par la séquence du gène DD1-a SEQ ID N°1 est le polypeptide de séquence SEQ ID N°9 du listage de séquences.

Le polypeptide DD1-a possède un poids moléculaire calculé de 33408 daltons. Il possède 19 résidus d'acides aminés fortement basiques (K, R), 29 résidus d'acides aminés fortement acides (D,E), 98 acides aminés hydrophobes (A, I, L, F W, V) et 97 acides aminés polaires (N, C, Q, S, T, Y). Le polypeptide de séquence SEQ ID N°9 codé par le gène DD1-a possède un point isoélectrique calculé de 5,40 et une charge calculée à pH 7,0 de 8,61.

L'invention a donc encore pour objet un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°9 ainsi qu'un polypeptide

possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°9 ou un fragment ou un variant de celui-ci:

Pour le polypeptide codé par le gène DD1-b, deux polypeptides variants possédant entre eux une identité de 98% en acides aminés ont été identifiés par le demandeur.

En tenant compte des substitutions d'acides aminés permettant de différencier ces deux variants polypeptides codés par le gène DD1-b, il a été possible de définir une famille de polypeptides fortement homologues comprenant des résidus d'acides aminés variants, qui est défini comme le polypeptide de séquence SEQ ID N°10 du listage de séquences.

Le premier polypeptide variant codé par le gène DD1-b est le polypeptide de séquence SEQ ID N°11 du listage de séquences.

Le second polypeptide variant codé par le gène DD1-b selon l'invention est le polypeptide de séquence SEQ ID N°12 du listage de séquences.

Le polypeptide de séquence SEQ ID N°12 a un poids moléculaire apparent de 31357 daltons. Le polypeptide de séquence SEQ ID N°12 possède 18 résidus d'acides aminés fortement basiques (K,R), 27 résidus d'acides aminés fortement acides (DE), 91 acides aminés hydrophobes A,I,L,F,W,V) et 91 acides aminés polaires (N, C,Q, S, T, Y).

Le polypeptide de séquence SEQ ID N°12 a un point isoélectrique calculé de 5,44 et une charge calculée à pH 7,0 de -7,74.

L'invention est donc également relative à un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°10 ainsi qu'à un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°10 ou un fragment ou un variant de celui-ci.

L'invention a encore pour objet un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°11 ainsi qu'un polypeptide

possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°11, ou un fragment ou un variant de celui-ci.

Un autre objet de l'invention consiste en un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°12 ainsi qu'un
5 polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°12, ou un fragment ou un variant de celui-ci.

Un fragment d'un polypeptide selon l'invention, comprendra au moins 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ou 250 acides aminés consécutifs d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à
10 12.

Fait également partie de l'invention un polypeptide comprenant 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ou 250 acides aminés consécutifs d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12.

L'invention est également relative à un polypeptide comprenant
15 une séquence en acides aminés ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12.

Avantageusement, fait aussi partie de l'invention un polypeptide ayant au moins 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% d'identité en acides
20 aminés avec la séquence d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12, ou un fragment peptidique de ce dernier.

De manière générale, les polypeptides selon la présente invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

Un autre objet de l'invention consiste en un polypeptide
25 comprenant des modifications d'acides aminés de 1, 2, 3, 4, 5, 10 à 20 substitutions, additions ou délétions d'un acide aminé par rapport à la séquence d'acides aminés d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12 ou encore d'un fragment ou d'un variant de celui-ci.

Un polypeptide selon l'invention peut être obtenu par
30 recombinaison génétique selon des techniques bien connues de

l'homme du métier, par exemple des techniques décrites dans AUSUBEL et al. (1989).

Un polypeptide selon l'invention peut être également préparé par des techniques classiques de synthèse chimique, indifféremment en solution homogène ou en phase solide.

A titre illustratif, un polypeptide selon l'invention pourra être préparé par la technique en solution homogène décrite par HOUBEN WEIL (1974) ou encore par la technique de synthèse en phase solide décrite par MERRIFIELD (1965a; 1965b).

De préférence, les polypeptides variants d'un polypeptide selon l'invention conservent leur capacité à être reconnus par des anticorps dirigés contre les polypeptides de séquences SEQ ID N°9 à 12.

Un polypeptide codé par le gène DD1-a ou le gène DD1-b selon l'invention, tel qu'un polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N°9 à 12, ou encore un variant ou un fragment peptidique de ce dernier est utile notamment pour la préparation d'anticorps destinés à la détection de la présence et/ou de l'expression d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12 ou d'un fragment peptidique de ce dernier dans un échantillon.

Outre la détection de la présence d'un polypeptide codé par le gène DD1-a ou le gène DD1-b ou encore d'un fragment peptidique d'un tel polypeptide dans un échantillon, des anticorps dirigés contre ces polypeptides sont utilisés pour quantifier la synthèse d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12, par exemple dans des cellules d'une plante, et déterminer ainsi la capacité de cette plante à transférer des métabolites de la plante mère vers l'albumen du grain en formation ou encore la capacité de résistance d'une telle plante à divers pathogènes de végétaux.

Par « anticorps » au sens de la présente invention, on entendra notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple les fragments $F(ab)_2$, $F(ab)$) ou encore tout polypeptide

comprenant un domaine de l'anticorps initial reconnaissant le polypeptide ou le fragment de polypeptide cible selon l'invention.

Des anticorps monoclaux peuvent être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par KOHLER et MILSTEIN
5 (1975)

La présente invention concerne également des anticorps dirigés contre un polypeptide tel que décrit ci-dessus ou un fragment ou un variant de ce dernier, tel que produit dans la technique du trioma ou encore la technique d'hybridome décrite par KOZBOR et al. (1983).

10 L'invention a également trait à des fragments d'anticorps simple chaîne Fv (ScFv) tels que décrits dans le brevet US N°4,946,778 ou encore par MARTINEAU et al. (1998).

Les anticorps selon l'invention comprennent également des fragments d'anticorps obtenus à l'aide de banques de phages telles que
15 décrites par RIDDER et al. (1995) ou encore des anticorps humanisés tels que décrits par REINMANN et al. (1997) et LEGER et al. (1997). Les préparations d'anticorps selon l'invention sont utiles dans des tests de détection immunologiques destinés à l'identification de la présence et/ou de la quantité d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°9 à 12, ou d'un
20 fragment peptidique de celui-ci, présent dans un échantillon.

Un anticorps selon l'invention pourra comprendre en outre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

25 Ainsi, l'invention a en outre pour objet un procédé pour détecter la présence d'un polypeptide conforme à l'invention dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de:

a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que décrit ci-dessus;

30 b) détecter le complexe antigène/anticorps formé.

L'invention est également relative à un nécessaire ou kit de diagnostic pour la détection de la présence d'un polypeptide conforme à l'invention dans un échantillon, ledit nécessaire comprenant:

- a) un anticorps tel que défini ci-dessus;
- 5 b) le cas échéant, un ou plusieurs réactifs nécessaires à la détection du complexe antigène/anticorps formé.

La présente invention est en outre illustrée sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants:

10

Figures

La figure 1 représente la séquence génomique codante du gène DD1-a, identique à la séquence SEQ ID N°5. La ligne supérieure représente le brin codant et la ligne inférieure représente le brin non
15 codant. Chacun des cinq exons du gène DD1-a est représenté par des boîtes.

La figure 2 représente la séquence génomique codante du gène DD1-b. Cette séquence est identique à la séquence SEQ ID N°6. La ligne supérieure représente la séquence du brin codant et la ligne
20 inférieure représente la séquence du brin non codant. Chacun des quatre exons du gène DD1-b est représenté par des boîtes.

La figure 3 représente la séquence partielle de l'ADNc correspondant au gène DD1-a.

La ligne supérieure représente la séquence nucléotidique du
25 brin codant. La ligne inférieure représente la séquence d'acides aminés déduite.

La figure 4 représente la séquence de l'ADNc correspondant à un produit de transcription du gène DD1-b. Les régions 5'-UTR et 3'-UTR sont représentées par des flèches. La phase de lecture ouverte est
30 représentée par une boîte. La boîte désignée « DD1 AMPLICON » est l'ADNC partiel de séquence SEQ ID N°26 à partir de laquelle les

amorces destinées à l'élongation en 5' (5' RACE) et vers l'extrémité 3' (3'RACE) ont été conçues. La ligne inférieure représente la séquence en acides aminés du polypeptide DD1-b de séquence SEQ ID N°12.

La figure 5 représente la séquence de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-a de séquence SEQ ID N°3. Les boîtes
5 représentent les différents motifs caractéristiques d'une région régulatrice retrouvés dans cette séquence et qui sont définis de manière précise dans la description.

La figure 6 représente la séquence de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-b de séquence SEQ ID N°4. Les boîtes
10 représentent les différents motifs retrouvés dans cette séquence et qui sont définis plus précisément dans la description.

La figure 7 représente une carte du vecteur L 127a5 qui comprend la cassette d'expression inutilisée pour exprimer un gène d'intérêt sous le contrôle de différents fragments des acides nucléiques
15 régulateurs des gènes DD1-a et DD1-b.

La figure 8 représente une carte du vecteur L 246a dans lequel le gène rapporteur GUS est placé sous le contrôle d'un fragment d'environ 3 kb de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-a.

La figure 9 illustre une carte du vecteur L246b qui comprend le gène rapporteur GUS placé sous le contrôle d'un fragment d'environ 1 kb de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-a.
20

La figure 10 représente une carte du vecteur L247a qui comprend le gène rapporteur GUS placé sous le contrôle d'un fragment d'environ 2,5 kb de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-b.
25

La figure 11 représente une carte du vecteur L247b qui comprend le gène rapporteur GUS placé sous le contrôle d'un fragment d'environ 1,6 kb de l'acide nucléique régulateur du gène DD1-b.

La figure 12 représente un alignement entre les séquences en acides aminés du polypeptide DD1-a de séquence SEQ ID N°9, du polypeptide DD1-b de séquence SEQ ID N°11 et du polypeptide DD1-b
30

de séquence SEQ ID N°12. La ligne supérieure représente une séquence en acides aminés consensus. La seconde ligne représente la séquence en acides aminés déduite de la séquence partielle de l'ADNc codant pour DD1-a. La 3^{ème} ligne représente la séquence de la protéine DD1-a. Les deux lignes inférieures représentent les séquences en acides aminés des deux variants polypeptidiques de DD1-b de séquences SEQ ID N°11 et SEQ ID N°12.

La figure 13 illustre le profil d'expression des gènes DD1-a et DD1-b. Après transcription inverse et amplification par PCR (RT-PCR), les ADN ont été transférés sur membrane puis hybridés avec la sonde de séquence SEQ ID N°26. L'expression a été visualisée à partir d'ADN amplifiés dans les tissus suivants: soles, épis, tiges; feuilles; racines et l'albumen à 7, 9, 12 et 15 jours après pollinisation (JAP). La piste désignée M correspond au marqueurs moléculaires utilisés comme témoins.

La figure 14 illustre le profil d'expression tissulaire des gènes DD1-a et DD1-b réalisés à l'aide d'hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales de grain de maïs de 7, 9, 12 et 15 jours après pollinisation (JAP). a, b, 7 JAP; c, d, 9 JAP et 12 JAP; g, h15 JAP.

a, c, e, g sonde DD1 antisens; b,d, f, f témoin négatif (sonde DD1 sens).

EXEMPLE 1:

A-MATERIEL ET METHODES

A-1 LIGNEES VEGETALES

Les plantes de la lignée A188 (GERDES et TRACY, 1993) ont été utilisées pour l'isolement d'ARN et pour la réalisation des hybridations *in situ*. Les grains de ces plantes, obtenus par pollinisation à la main, ont été récoltés à différents stades compris entre 7 et 15 JAP.

Les fragments d'ADN contenus dans la banque génomique criblée proviennent quant à eux de la lignée hybride HD5xHD7. La cartographie a été réalisée grâce aux lignées recombinantes stables issues des croisements Co159xTx303 et Cm37xT232, (BROOKHAVEN NATIONAL
5 LABORATORY, Upton, N.Y. Etats-Unis). Toutes ces plantes ont été cultivées en serre, avec une période d'éclairement de 16 h, une humidité relative de 80%, et une alternance 24°C/19°C (jour/nuit).

A-2 CLONAGE

10

L'ADN plasmidique a été préparé suivant le protocole de lyse alcaline décrit par SAMBROOK et al. (1989). Les digestions d'ADN génomique et plasmidique par des enzymes de restriction ont été réalisées selon les conseils des fabricants (GIBCO, BOEHRINGER
15 MANNHEIM, PROMEGA). Les produits de digestion ou d'amplification par PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dans du tampon TAE SAMBROOK et al. 1989). Les fragments de restriction ont été ligués dans le vecteur pBluescript et les produits PCR dans le vecteur pGEM-T-easy, à l'aide de la T4-DNA ligase suivant les conseils
20 du fournisseur (Promega), en utilisant 50 ng de vecteur, et un rapport molaire insert/vecteur de l'ordre de 3/1. Ces constructions ont été introduites dans la souche bactérienne DH5α par transformation par choc thermique, selon le protocole de HANAHAN (1983).

25

A-3 SEQUENCAGE

Les réactions de séquençage ont été réalisées soit à partir de mini-préparations d'ADN plasmidique ayant subi une extraction volume à volume au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) pH 8 et une
30 précipitation à l'éthanol, soit à partir de produits PCR purifiés à l'aide du kit « QIAquick PCR purification » (Qiagen). Les produits de la réaction

« dye terminator » obtenus avec le kit « Thermo Sequenase » (Amersham) ont migré sur un séquenceur automatique ABI 373 A (Applied Biosystems).

Les logiciels Sequencher 3.1.1 (Gene Codes Corporation) et DNASTar (Laser Gene) ont permis d'analyser et d'assembler les séquences obtenues. Les bases de données ont été consultées avec le logiciel blast (Basic local Alignment S Tool, National Center for Biotechnology Information, ALTSCHUL et al., (1997). Des motifs de « signature » protéiques ont été recherchés dans les bases de données « Prosite profiles », « Prosite patterns », « Pfam » et « Gribkov collection », disponibles sur le serveur de l'ISB (Institute of Swiss Bioinformatics).

A-4 Southern blot

15

Les fragments d'ADN ont été transférés des gels d'agarose sur des membranes de nylon (Hybond N+, Amersham) par capillarité, en présence de soude 0,4N. Les membranes ont été préhybridées selon les conseils du fournisseur, pendant 4 à 12 h en conditions stringentes (à 65°C, en présence de SSPE 5x et sans formamide). Puis elles ont été hybridées pendant 16 h dans les mêmes conditions. Les sondes utilisées pour l'hybridation ont été marquées radioactivement avec 50µCi d' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, selon le protocole suivant : 25 à 100 ng d'ADN linéaire ont été dénaturés 5 min dans l'eau bouillante, dans un volume de 9 µl, avec deux amorces spécifiques antiparallèles (séquences listées dans le tableau 10) à une concentration finale de 5 µM.

TABLEAU 10

Séquences de 5' vers 3' des amorces utilisées pour la fabrication
de sondes radioactives (§ A.4) et pour la « RT-PCR » (§ A.5):

orientation	nom	séquence	spécificité
sens	GAPDH5	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG SEQ ID N°18	GAPDH
antisens	GAPDH3	GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA SEQ ID N°19	GAPDH
sens	154U	CACTGGATGCTTTAACCTGGACTGT SEQ ID N°20	DD1-a et DD1-b
antisens	154L	CATTGCCCATGGGAGGACTTG SEQ ID N°21	DD1-a et DD1-b
sens	GM2	CTGCTGGTGGATATACAGGTG SEQ ID N° 30	DD1-a et DD1-b
antisens	203-3'	TGAATAGAGGATGATACAAGCAA SEQ ID N° 31	DD1-a
antisens	204-3'	GATTTGAATAGAGGATGATACAAGAC SEQ ID N° 32	DD1-b

Puis l'ADN et les amorces ont été hybridés 10 min à température ambiante et 5 min sur glace. Les réactifs suivants ont alors été ajoutés sur glace: 2 µl de dAGT (200 µM chacun: dATP, dGTP, dTTP) 1µl SAB (1 mg/ml), 2µl tampon de restriction #Z concentré 10x(GIBCO), 5 µl d' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (activité 3000 Ci/mmol), et 1 µl d'enzyme de Klenow (1 U/µl). Les fragments d'ADN ont été marqués à 37°C pendant 45 minutes, puis l'élongation a été prolongée par une incubation de 15 min avec 1 µl de dCTP froid 200 µM et 1 µl d'enzyme de Klenow.

Les sondes ainsi obtenues ont été purifiées sur des colonnes de Sepharose CL-6B par centrifugation 3 minutes à 400g.

Après hybridation, les membranes ont subi quatre rinçages , à 65°C dans des solutions à 0,1% de SDS et de concentrations en SSC de 2x, 1x, 0,5x et 0,1x, et ont été exposées à des films pour autoradiographie (X-OMAT, Kodak).

5

A-5 (« RT-PCR »)

Des grains de maïs ont été disséqués sous la loupe binoculaire à différents stades de développement (7, 9, 12 et 15 JAP) en séparant l'embryon de l'albumen. Les ARN totaux de ces deux organismes ont été extraits selon le protocole décrit par Mc PHERSON et al. (1991). Ces différentes manipulations ont été conduites en parallèle sur des tissus témoins de plantes du même génotype: soies de 10 cm, tiges, feuilles et racines matures, et jeunes épis non pollinisés de 10 cm.

Les ARN, resuspendus dans 50 µl d'eau Versol (Aguettant), ont été dénaturés à 65°C pendant 5 min et traités à la DNase I selon les indications du fournisseur (Promega). Ils ont ensuite été purifiés par deux extractions volume à volume au phénol:chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) pH 4,5 et une précipitation à l'éthanol, 6 µg d'ARN purifiés ont été « reverse » transcrits par la MuLV reverse transcriptase (Gibco) dans un volume total de 20 µl comme conseillé par le fournisseur, avec les amorces antisens présentées dans le tableau 10 ci-dessus, à une concentration finale de 2,5 µM.

Après inactivation de la reverse transcriptase par chauffage à 95°C pendant 5 min, 2 µl de la réaction de transcription inverse ont été amplifiés par la Taq polymérase avec le tampon fourni par le fabricant (Pharmacia). Les couples d'amorces sens/antisens présentés dans le tableau 10 ont été utilisés à une concentration finale de 1 µM. La réaction a été réalisée dans un amplificateur PCR Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 2400 de la façon suivante: après dénaturation de l'ADN 2 min à 94°C, les échantillons ont subi 30 cycles de 30 s de dénaturation à 94°C/45 s d'hybridation à 55°C/1 min d'élongation à 72°C.

30

Une amplification des transcrits du gène Gapdh a constitué le témoin positif de transcription inverse. En effet, ce gène code pour une enzyme impliquée dans la glycolyse, la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, dont l'expression est ubiquitaire et constitutive. Une

5 amplification a également été réalisée en omettant les ARN, afin de disposer d'un témoin négatif attestant de l'absence d'ADN contaminant dans les réactifs.

A-6 ELONGATION D'AMORCES (« RACE-PCR »)

Le kit « Marathon cDNA Amplification » a été utilisé pour obtenir

10 des extrémités d'ADNc, en suivant les indications du fabricant (CLONTECH), à l'aide des amorces suivantes:

TABLEAU 11

Séquences de 5' vers 3' des amorces utilisées pour la

« RACE-PCR »

15

		1°) réaction d'amplification	2°) réaction d'amplification (« nested primer »)
Amorce	5' RACE	TTC ACTAGT GTTTGATC CCTGGCCAGTAGAATC (SEQ ID N°22)	CCACCCCAGGTTATGA ATCCAGCGTG (SEQ ID N°24)
Amorce	3' RACE	CCACTGGATGCTTTAA CCTGGACTGTAATGGT (SEQ ID N°23)	AAGATGATGGAGATTG GTGGCTACACTTTGGA TA (SEQ ID N°25)
Amorce adaptateur	5' et 3' RACE	CCATCCTAATACGACT CACTATAGGGC (SEQ ID N°27)	ACTCACTATAGGGCTC GAGCGGC (SEQ ID N°28)

Cette technique repose sur l'amplification de fragments d'ADNc aux extrémités desquels ont été ligués des adaptateurs. Les ADNc utilisés pour la réaction ont été préparés à partir d'ARN polyA+ extraits

20 de la partie basale de grains de maïs de 7 JAP, comprenant l'embryon et

la partie basale de l'albumen. Une première amplification a été effectuée entre une amorce spécifique de DD1 (contenant au moins 50% de GC; température d'hybridation entre 65 et 70°C; située à une extrémité du clone partiel) et une amorce située dans un adaptateur ligué à l'autre
5 extrémité de l'ADNc servant de matrice. Les produits de cette réaction sont alors amplifiés avec une amorce spécifique située plus à l'intérieur de l'amplicon et une autre amorce de l'adaptateur.

Afin de disposer d'un témoin positif de la présence du gène DD1 parmi les ADNc utilisés, une amplification a été réalisée entre les
10 deux amorces SEQ ID N°20 et SEQ ID N°21. Le témoin négatif, qui vérifie l'absence d'ADN amplifiable dans les réactifs, a été obtenu en remplaçant les ADNc par de l'eau, puis en amplifiant par les amorces situées en 5'.

15 A.7 HYBRIDATION IN SITU

Les hybridations *in situ* ont été réalisées selon le protocole de COEN et al. (1990), avec les modifications décrites par BRADLEY et al. (1993). Les principales étapes en sont, en résumé:

20

A.7.1 PREPARATION DES TISSUS

Les grains isolés ont été immergés dans une solution de fixation à 4% de paraformaldéhyde et infiltrés sous vide. Puis ils ont été
25 déshydratés par des incubations successives dans des solutions éthyliques salées de degré croissant en éthanol. Les échantillons ont alors été imprégnés pendant plusieurs jours dans un mélange d'Histoclear II (National Diagnostics) et de paraffine (Paraplast Plus, Sherwood Medical Co) en concentration croissante. Ils ont ensuite été
30 inclus dans de petits blocs de paraffine pure pour être coupés au microtome, en sections longitudinales et transversales de 7 µm

d'épaisseur. Ces coupes ont été fixées sur des lames Probe-On Plus préchargées positivement (Fisher Scientific).

A.7.2. FABRICATION DE SONDES MARQUEES A LA DIGOXINENINE

5

Les sondes DD1 sens et antisens ont été obtenues par transcription *in vitro* d'un ADNc partiel du gène DD1 (SEQ ID N°26) cloné dans les deux orientations dans le vecteur pGEM-T-easy. Toutes les transcriptions *in vitro* ont été réalisées par la T7-ARN polymérase, en présence des nucléotides suivants: ATP, CTP et GTP 1 mM, UTP 0,65 mM, et digoxinénine-11-UTP 0,35 mM.

10

A.7.3. HYBRIDATION

15

Les lames ont été hybridées avec la sonde pendant 16 h, à 55°C, dans un tampon d'hybridation contenant entre autre 50% de formamide. Elles ont ensuite été rincées à 55°C dans une solution à 0,1% de SDS et de concentration en SSC de 0,1x pendant 30 min, puis dans une solution à 50% de formamide et de concentration en SSC de 2x pendant deux fois 1 h 30 min, avec agitation lente.

20

A.7.4 REVELATION

25

Après une incubation de 1 h 30 min avec une dilution 1/1000 d'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline, les lames ont été révélées par une solution de NBT (nitroblue tetrazolium chloride) et BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt), des substrats chromogènes de la phosphatase alcaline. Elles ont ensuite été lavées dans des bains de 30 à 100% d'éthanol, et colorées au calcofluor à 0,1%. Les photographies ont été faites sous un microscope avec un

30

objectif Plan fluor 10/0,30, à l'aide d'un appareil Nikon FDX 35 sur des pellicules Kodak Elite Chrome 100 ASA.

A.8. CRIBLAGE DE BANQUE D'ADN GENOMIQUE

5

Une banque d'ADN génomique contenue dans le phage lambda EMBL3 SP6/T7 (Stratagene) a été étalée à la densité de $1,5 \times 10^5$ plages de lyse par boîte, sur 10 boîtes, puis transférée sur membrane Hybond N, selon la technique décrite par SAMBROOK et al. (1989). Les membranes ont été hybridées avec la sonde de séquence SEQ ID n° 29 provenant d'un clone d'ADN génomique partiel du gène DD1-b marqué radioactivement. Après révélation des membranes en autoradiographie, les plages de lyse donnant un signal ont été prélevées sur les boîtes et étalées à une densité moindre, ainsi deux fois de suite afin d'obtenir un clone unique par boîte, sous forme de plages isolées. Les ADN ont alors été préparés selon SAMBROOK et al. (1989).

15

A.9.- CARTOGRAPHIE

20

La cartographie a été réalisée comme décrit par BURR et BURR (1991). L'ADN génomique des lignées parentales Co159, Tx303, Cm37 et T232 a été digéré par les enzymes de restriction suivantes: BamHI, EcoRI, HindIII, EcoRV, PstI, XbaI, SacI, SpeI, XhoI, SalI, PvuII, et ClaI, et transféré sur membrane de nylon (voir paragraphe A.4). Une sonde marquée radioactivement, correspondant à un clone d'ADN génomique partiel du gène DD1-b de séquence SEQ ID N°29, a été utilisée pour identifier des polymorphismes de longueur des fragments de restriction.

25

Un polymorphisme a été observé avec la digestion par EcoRI de l'ADN des deux parents Co 159 et Tx303 et l'ADN génomique de 41 descendants Co159xTx303 a donc été digéré par EcoRI. Selon que la

30

digestion a conduit à l'obtention du même polymorphisme que le parent Tx303 ou que le parent Co159, un score de 1 ou de 2 a été respectivement attribué à l'individu. Pour les individus chez qui la discrimination n'a pas été possible, il a été attribué un x.

5 Ces résultats ont permis de déterminer la position des gènes sur la carte génétique du maïs, à l'aide du programme Map Maker.

B - RESULTATS

B.1. PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DD1

10

Afin d'obtenir des profils d'expression spatio-temporelle précis des gènes DD1, la technique de « RT-PCR » a été utilisée avec les oligonucléotides du tableau 10 et la séquence SEQ ID N°26 comme sonde. Les résultats des « RT-PCR » relatifs à l'albumen et aux tissus

15 témoins sont représentés sur la figure 13.

Le gène DD1 (figure 13) n'est pas exprimé dans les tissus végétatifs, mais présente une fenêtre d'expression très étroite dans l'albumen, située entre 7 et 9 JAP. Des expériences supplémentaires sur grain entier montrent que l'expression commence avant 7 JAP. Une

20 faible expression est même détectable dans l'ovule mature avant fécondation. Le maximum d'expression se situe à 7 JAP. A 12 JAP, on peut encore observer un signal très faible, qui disparaît totalement à 15 JAP. L'expression de DD1 est donc spécifique de la phase précoce du développement de l'albumen. La sonde DD1 donne également un signal

25 dans la piste du marqueur de taille, car de petites régions du vecteur de clonage présentes aux extrémités de la sonde sont homologues aux séquences du marqueur.

B.2 CARACTERISATION DE DD1

30 B.2.1 PROFIL D'EXPRESSION TISSULAIRE DE DD1

Afin de préciser le profil d'expression tissulaire de DD1, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des coupes longitudinales de grains de maïs de 7, 9, 12 et 15 JAP. Avec une sonde antisens, on observe un signal restreint à la zone de transfert de l'albumen. Ce signal est fort à 7 et à 9 JAP (figures 14a et 14c, puis plus faible à 12 JAP (figure 14e), indiquant une diminution du niveau d'expression de l'ARN correspondant au gène DD1. A 15 JAP, on n'observe plus aucun signal (figure 14g), ni dans la zone de transfert, ni dans le reste du grain. Une sonde sens, utilisée comme contrôle négatif, ne donne qu'un signal diffus qui correspond au bruit de fond (figures 14b, d f h). Des expériences sur des stades plus précoces montrent une expression dans le sac embryonnaire (gamétophyte femelle) avant fécondation et une expression à la base du grain à 5 JAP. Ceci confirme les résultats obtenus par RT-PCR : le gène DD1 est spécifiquement exprimé dans le gamétophyte femelle avant la fécondation et à la base du grain entre la fécondation et le stade 12 JAP. Cette zone d'expression coïncide avec la zone de transfert dès sa différenciation à 7 JAP.

B-2.2. CLONAGE DE L'ADNC DU GENE DD1-B

Afin d'obtenir la séquence d'ADNc de DD1, nous avons effectué une « RACE-PCR » vers chaque extrémité du gène. Après « DNA gel blot » des produits des deux réactions, on obtient plusieurs bandes après hybridation avec la sonde DD1 (SEQ ID N°26) entre 0,4 et 0,8 kb pour la réaction 5', et entre 0,4 kb et 0,6 kb pour la réaction 3'. Les produits de ces deux réactions ont été clonés et séquencés. Toutes les séquences correspondaient au gène désigné plus tard comme DD1-b.

B-2.3 SEQUENCE DE DD1

Les séquences des produits des réactions 5' et 3' étant chevauchantes, une séquence consensus de 1075 pb a été obtenue sur

la base des clones les plus longs vers chaque extrémité. Cette séquence contient un cadre ouvert de lecture de 858 pb, et plusieurs sites de polyadénylation. Elle code pour une protéine de 286 acides aminés, très hydrophile, qui comporte néanmoins un domaine hydrophobe dans sa partie N-terminale. La séquence d'ADNc ne révèle aucune homologie significative avec les bases de données de séquences.

B.2.4- CLONES GENOMIQUES DE DD1

10 Pour élucider la structure intron/exon et avoir accès au promoteur, il était nécessaire de disposer de clones génomiques. L'amplicon DD1 (SEQ ID N°26, (382 pb) semblait trop petit pour produire une bonne sonde utilisable pour le criblage de banque et la cartographie. Aussi, une amplification par PCR sur ADN génomique a été réalisée, à
15 l'aide des mêmes amorces (SEQ ID N°20 et SEQ ID N°21) que celles utilisées pour la « RT-PCR » (tableau 10). L'obtention de deux produits de taille supérieure à celle des produits de la « RT-PCR » a montré qu'il existe dans l'ADN génomique au moins un intron entre les deux amorces spécifiques. Ces deux fragments, d'environ 1,2 kb et 1,5 kb, ont été
20 clonés puis entièrement séquencés. Leurs séquences exoniques comme introniques sont très homologues. Le plus grand fragment contient deux insertions, de 49 et 282 pb, ainsi que 26 délétions ponctuelles. Ceci est une première indication de la présence de deux gènes DD1-a (produit de 1,5 kb) et DD1-b (produit de 1,2 kb) dans le génome du maïs.

25 Disposant de clones suffisamment longs, une banque d'ADN génomique a été criblée utilisant comme sonde le fragment d'environ 1,2 kb de DD1-b (SEQ ID N°29). Ce fragment présente suffisamment d'homologie avec le fragment d'environ 1,5 kb de DD1-a pour lui permettre de s'hybrider avec les deux gènes, mais ne contient pas les
30 insertions qui pourraient correspondre à des séquences répétées, et

donc s'hybrider avec d'autres parties du génome sans relation avec les gènes DD1.

Lors du premier criblage, trente clones positifs en autoradiographie ont été obtenus. Les plages de lyse correspondantes ont été prélevées et testées par PCR pour la présence des fragments de 1,5 kb (DD1-a) ou de 1,2 kb (DD1-b). Pour le deuxième tour de criblage, nous avons retenu 3 clones donnant un fragment PCR de 1,5 kb, 2 clones donnant une bande de 1,2 kb, ainsi que 7 clones ne présentant pas de fragment d'amplification. Après hybridation, 8 de ces 12 clones émettaient des signaux, notamment tous ceux qui avaient répondu en PCR. Nous avons donc étalé à nouveau ces clones pour obtenir des plages de lyse isolées. Pour chaque clone, l'ADN d'une plage a été isolé et digéré par les enzymes Sall, XbaI, ainsi que par les deux enzymes simultanément. Une fois hybridées, les membranes de ces digestions nous ont permis d'identifier des fragments de restriction contenant au moins une partie de DD1. Pour un clone lambda DD1-a et un clone lambda DD1-b les fragments de restriction ont été sous-clonés, et les différents types de sous-clones ont été séquencés.

Les séquences obtenues sont répertoriées ici comme SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2. Elles contiennent les régions régulatrices, les régions codantes et des régions en aval des gènes DD1-a et DD1-b.

B 2.5 CARTOGRAPHIE DES GENES DD1

La cartographie peut apporter des renseignements sur la fonction d'un gène si celui-ci co-cartographie avec une mutation de phénotype connu. Pour cartographier les gènes DD1, nous disposons de deux populations de lignées recombinantes stables, issues des croisements Co159xTx303 et T232xCm37. Pour trouver des polymorphismes de longueur des fragments de restriction des gènes DD1, nous avons digéré l'ADN des 4 lignées parentales par différentes

enzymes. Après hybridation avec une sonde correspondant au clone génomique partiel de DD1-b de 1,2 kb (SEQ ID N°29), plusieurs polymorphismes ont été révélés. La digestion par XhoI montre un polymorphisme entre les parents T232 et Cm37; les digestions par HindIII et ClaI entre les lignées Tx303 et Co159; enfin les digestions par BamHI, EcoRI, EcoRV, XbaI et SacI montrent l'existence d'un polymorphisme chez les deux couples de parents. Par ailleurs, le nombre de bandes hybridantes (entre 1 et 4) indique un faible nombre de copies du gène DD1 dans le génome du maïs.

Les gènes DD1 ont été cartographiés en digérant par EcoRI l'ADN de 41 individus Co159xTx303. L'hybridation des membranes avec la même sonde montre la présence de trois fragments de restriction dans chaque plante, dont deux ségrègent de façon indépendante (tableau 12). Comme attendu la sonde de 1,2 kb reconnaît donc deux gènes différents.

TABLEAU 12

Polymorphismes observés après digestion par EcoRI des

ADN de 41 individus Co159xTx303

(classés de gauche à droite), où 1=Co159, 2=Tx303 et

x = illisible

Gène DD1-a	x1111112122211222121x22112111221212x11121
Gène DD1-b	11212112111121112112x2212112222122x21212

La position exacte des gènes DD1-a et DD1-b par rapport à des marqueurs connus sur la carte génétique du maïs a été déterminée. Le gène DD1-a se trouve sur le bras long du chromosome 8, à la position 130,5 centimorgans, entre le marqueur bnl17.17 et le gène sps1. Le gène DD1-b est situé sur le bras long du chromosome 6, à la position 78 centimorgans, entre les marqueurs pl1 et tug8.

B 2.6. EXPRESSION DES DEUX GENES DD1-a ET DE DD1-b

Le séquençage de clones génomiques et la cartographie avaient mis en évidence l'existence de deux gènes DD1 dans le génome du maïs. Cependant l'expression des deux gènes ne pouvait pas être affirmée par les expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ* décrites ci-dessus, parce que les amorces et sondes utilisées ne différenciaient pas entre les deux gènes. La quasi-identité entre tous les clones RACE et le gène DD1-b était une première preuve de l'expression du gène DD1-b. Pour confirmer ce résultat et pour adresser l'expression du gène DD1-a, de nouveaux expériences de RT-PCR ont été entreprises. Les amorces 203-3' et 204-3' (Tableau 10) spécifiques respectivement de DD1-a et de DD1-b ont été testées en combinaison avec l'amorce GM2 (Tableau 10) s'hybridant sur les deux gènes. Sur des ADN plasmidiques contenant soit un fragment DD1-a ou un fragment DD1-b une amplification a été obtenue uniquement avec l'amorce correspondante. Par la suite des ADNc de caryopses de 7 JAP ont été amplifiés avec les couples GM2/203-3' et GM2/204-3'. Une bande hybridant à une sonde DD1 a été obtenue dans les deux cas. Le clonage et séquençage des fragments correspondants a montré qu'il s'agissait d'ADNc de DD1-a et de DD1-b. Par conséquent les deux gènes sont exprimés dans des caryopses de 7 JAP. Par ailleurs le séquençage du produit GM2/203-3' a révélé la présence d'une petite insertion de 54 pb par comparaison au produit GM2/204-3'. Cette séquence a été retrouvée dans l'ADN génomique de DD1-a. La présence de sites d'épissage canoniques à ses extrémités confirme la présence d'un petit exon. Une séquence homologue est présente dans l'ADN génomique de DD1-b, mais absente dans l'ADNc du gène DD1-b (clone RACE et produit GM2/204-3'). Il semblerait alors que les deux gènes DD1 aient assez divergé dans l'évolution pour permettre un épissage alternatif.

EXEMPLE 2:

Construction de vecteurs recombinants selon l'invention dans
lesquels est inséré un acide nucléique comprenant un
polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'un acide nucléique
régulateur du gène DD1-a ou du gène DD1-b.

Plusieurs vecteurs comprenant un acide nucléique régulateur
du gène DD1-a ou du gène DD1-b localisé en amont d'un gène
rapporteur, le gène GUS, ont été réalisés.

Le vecteur de départ destiné à recevoir les inserts d'ADN
d'intérêt est le vecteur L127a5 représenté dans la figure 7. Le vecteur
L127 a 5 ainsi que sa construction sont décrits par BONELLO et al.
(2000). Dans cet article, le vecteur L 127 a 5 est désigné prEsr3-GUS.

Pour chacune des séquences régulatrices respectives du gène
DD1-a et du gène DD1-b, deux constructions de vecteurs ont été
réalisées; chacune des constructions comprenant un fragment long ou
au contraire un fragment court de la séquence régulatrice.

Les séquences régulatrices des gènes DD1-a et DD1-b ont tout
d'abord été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces contenant des sites
de restriction.

Après digestion avec des endonucléases de restriction
appropriés, les fragments amplifiés des séquences régulatrices sont
intégrés dans le plasmide L127a5 représenté à la figure 7 et décrit
également dans la demande de brevet français N° 99 12305 déposée le
1er Octobre 1999.

Le tableau 13 ci-après représente schématiquement les
différentes constructions réalisées.

Tableau 13

construction	promoteur	taille promoteur	primer 5'	site	primer 3'	
L246a	DD1-a	3,0 kb	203 (3,0)	PstI	Gus	XbaI
L246b	DD1-a	1,0 kb	203 (1,0)	HindIII	Gus	XbaI
L247a	DD1-b	2,5 kb	204 (2,5)	PstI	Gus	XbaI
L247b	DD1-b	1,6 kb	204 (1,6)	PstI	Gus	XbaI

5

amorce 203 (3,0) ATGCCTGCAGCTACCGCATCGCATTACTGGCTCTG
(SEQ ID N°13)

10 amorce 203 (1,0) ATGCAAGCTTTGCATTCACACCCCTAAAG
(SEQ ID N°14)

amorce 204 (2,5) ATGCCTGCAGGGGACCTGAGTGAGTTGA
(SEQ ID N°15)

amorce 204 (1,6) ATGCCTGCAGGAGATGCCAAGAATAAAGGGTAAAG
(SEQ ID N°16)

15 amorce Gus ATGCTCTAGATTTGTAAGGATGGTTATATTCTCT
(SEQ ID N°17)

Adaptateurs utilisés:

20 adaptateur JFB34 TCGACTGCAGCCCA
GACGTCGGGTTCGA

adaptateur JFB56 CTAGACCCGAATTCGC
TGGGCTTAAGCGCCGG

25 Le vecteur L246a a été construit après introduction d'une
séquence d'environ 3 kb du promoteur du gène DD1-a après
amplification d'un fragment génomique de ce gène à l'aide du couple
d'amorces de séquences SEQ ID N°13 (amorce 203(3,0)) et SEQ ID
N°17 (amorce GUS) puis digestion par les endonucléases de restriction
30 PstI et XbaI. (Figure 8).

Le vecteur L246b a été obtenu par introduction dans le vecteur
L127a5 d'un acide nucléique constituant le produit d'amplification d'un
fragment génomique du gène DD1-a à l'aide du couple d'amorces de
séquences SEQ ID N°14 (amorce 203(1,0)) et SEQ ID N°17 (amorce
35 GUS), avant digestion par les endonucléases de restriction HindIII et
XbaI. (Figure 9).

Le vecteur L247a a été obtenu par l'introduction dans le vecteur L127a5 d'un acide nucléique constituant le produit d'amplification d'un fragment génomique du gène DD1-b à l'aide du couple d'amorces de séquences SEQ ID N°15 (amorce 204(2,5)) et SEQ ID N°17 (amorce GUS) avant digestion par les endonucléases de restriction PstI et XbaI. (Figure 10). Le vecteur L318 est un dérivé de L247a. Il contient une fusion traductionnelle entre le deuxième exon de DD1-b et le gène rapporteur Gus. Le vecteur L247a a été digéré par les enzymes SpeI et SmaI et le fragment plus petit a été remplacé par un produit d'amplification obtenu par PCR avec les amorces DD1-b-FT-5' (SEQ ID N°33 et DD1-b-FT-3' (SEQ ID N°34) sur le plasmide L204b7 puis digéré par les enzymes SpeI et SmaI.

Séquences des amorces :

DD1b-FT5' : ATTATCATT CAGGTAGCAC ATCTCC (SEQ ID N°33)

DD1b-FT3' : TAATCCCGGG GACTTGCCAT TTGACACCCA CATTATT (SEQ ID N°34)

20

Le vecteur L247b a été réalisé par l'introduction dans le vecteur L127a5 d'un fragment d'amplification génomique obtenu à l'aide du couple d'amorces SEQ ID N°16 (amorce 204(1,6)) et SEQ ID N°17 (amorce GUS), avant digestion par les endonucléases de restriction PstI et XbaI. (Figure 11).

L'ADN génomique du gène DD1-a de départ utilisé pour amplifier les séquences d'intérêt destinées à être introduites dans les vecteurs L246a et L246b est contenu dans le plasmide L203b23, qui comprend un insert d'ADN génomique de 6 kb cloné avec les enzymes Sall et XbaI dans le vecteur pBCSK+ commercialisé par la Société Stratagene.

30

Le matériel de départ pour l'amplification des inserts d'ADN d'intérêt du gène DD1-b est le plasmide L204b17 qui comprend 12 kb d'un insert d'ADN génomique cloné avec l'enzyme XbaI dans le vecteur pBCSK+ commercialisé par la Société Stratagene.

5 Les fragments d'ADN génomique proviennent de clones lambda EMBL3 SP6/T7 d'une banque génomique du génotype HD5xHD7 obtenue après digestion partielle avec l'enzyme Sau3A décrite à l'exemple 1, au paragraphe A.8 de la section « Matériels et Méthodes ».

Les références pour le plasmide L127a5 sont les suivantes:

- 10 - plasmide pBSSK+ commercialisé par la Société Stratagene ;
- plasmide pBI101 décrit par JEFFERSON et al., 1987

EXEMPLE 3:

15 **Obtention de plantes transgéniques transformées par un transgène comprenant un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle d'une séquence régulatrice selon l'invention.**

La transformation d'une plante dans le but d'obtenir une expression stable du polynucléotide d'intérêt dans la plante transformée est nécessaire pour assurer une modification durable du grain de maïs.
20 Des essais sont réalisés avec une construction de vecteurs L246a, L246b, L247a et L247b décrits à l'exemple 2.

4-1 CANON A PARTICULES

25

La méthode utilisée repose sur l'utilisation d'un canon à particules identique à celui décrit par FINER (1992).

Les cellules cibles sont des cellules indifférenciées en divisions
30 rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal embryogène (dit de type II) de maïs. Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de

génotype Hill selon la méthode et sur les milieux décrits par ARMSTRONG (1994). Des fragments de tels cals d'une surface de 10 à 20 mm² ont été disposés, 4 h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les plasmides décrits dans les exemples précédents et portant les gènes à introduire, sont purifiés sur colonne Qiagen^R en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par KLEIN (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. FINER (1992). Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais^R puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif. On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélectif, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, multipliés puis cultivés de façon à régénérer des plantules, en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par VAIN et al. (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées pour l'obtention d'hybrides ou autofécondées.

5.2 Transformation par *Agrobacterium*

Une autre technique de transformation utilisable dans le cadre de l'invention utilise *Agrobacterium tumefaciens*, selon le protocole décrit par ISHIDA et al. (1996), notamment à partir d'embryons immatures de 10 jours après la fécondation. Tous les milieux utilisés sont référencés dans la référence citée. La transformation débute avec une phase de co-culture où les embryons immatures des plantes de maïs sont mis en contact pendant au moins 5 min avec *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 contenant les vecteurs superbinaires. Le plasmide superbinaire est le résultat d'une recombinaison homologue entre un vecteur intermédiaire porteur de l'ADN-T contenant le gène d'intérêt et/ou le marqueur de sélection dérivé des plasmides décrits dans les exemples précédents, et le vecteur pSB1 de Japan Tobacco (EP 672 752) qui contient: les gènes *virB* et *virG* du plasmide pTiBo542 présent dans la souche supervirulente A281 d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) et une région homologue retrouvée dans le vecteur intermédiaire permettant cette recombinaison homologue. Les embryons sont ensuite placés sur milieu LSAs pendant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Une première sélection est effectuée sur les cals transformés: les cals embryogènes sont transférés sur milieu LSD5 contenant de la phosphinotricine à 5 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l (élimination ou limitation de la contamination par *Agrobacterium tumefaciens*). Cette étape est menée 2 semaines à l'obscurité et à 25°C. La deuxième étape de sélection est réalisée par transfert des embryons qui se sont développés sur milieu LSD5, sur milieu LSD10 (phosphinotricine à 10 mg/l) en présence de céfotaxime, pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment. La troisième étape de sélection consiste à exciser les cals de type I qui restent blancs (fragments de 1 à 2 mm) et à les transférer 3 semaines à l'obscurité et à 25°C sur milieu LSD 10 en présence de céfotaxime.

La régénération des plantules est effectuée en excisant les cals de type I qui ont proliféré et en les transférant sur milieu LSZ en présence de phosphinotricine à 5 mg/l et de céfotaxime pendant 2 semaines à 22°C et sous lumière continue.

5 Les plantes ayant régénéré sont transférées sur milieu RM + G2 contenant 100 mg/l d'Augmentin pendant 2 semaines à 22°C et sous illumination continue pour l'étape de développement. Les plantes obtenues sont alors transférées au phytotron en vue de leur acclimatation.

10

EXEMPLE 4 – Test de l'activité du promoteur DD1-b

Pour tester l'activité de la construction L 247a contenant le gène rapporteur Gus sous contrôle du promoteur DD1-b, ce plasmide a été co-
15 transformé dans des protoplastes de tabac selon la technique du PEG (Pietrzak et al. 1986), avec un plasmide contenant le facteur de transcription ZmMRP-1 en aval d'un promoteur constitutif (GOMEZ et al., 1999 et GOMEZ et al., 2000). Une forte activité Gus a été observée indiquant que le promoteur contenait tous les éléments nécessaires pour
20 être reconnus par ce facteur de transcription spécifique de la base du grain de maïs.

TABLEAU 14
Séquences de l'invention

SEQ ID N°	
1	acide nucléique génomique du gène DD1-a
2	acide nucléique génomique du gène DD1-b
3	acide nucléique régulateur du gène DD1-a
4	acide nucléique régulateur du gène DD1-b
5	région codante du gène DD1-a
6	région codante du gène DD1-b
7	ADNc du gène DD1-a
8	ADNc du gène DD1-b
9	polypeptide codé par DD1-a
10	famille de polypeptides codés par DD1-b
11	polypeptide variant DD1-b
12	polypeptide variant DD1-b
13-25, 27-28 30-32	amorces
26 et 29	sondes

REFERENCES :

- AN et al. (1986), Plant Physiol. 81 : 86-91
- 5 • AOKI ET AL, Plant Cell Physiol, 1999, 40, 1072-1078
- ALTSCHUL et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-34025.
- AOYMA T et al., (1997) The Plant Journal, vol.11 (3):605-612
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN
JG, SMITH JA, STRUHL K Editors, *Current protocols In Molecular*
10 *Biology*, Wiley Interscience.
- AUSUBEL et al., 1994 (A CHERCHER S.V.P.)
- AUSUBEL et T al., 1989. Current Protocols in Molecular Biology,
Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.
- ANDERSON et al. T.A.G. (1989), 77: 86-91
- 15 • BEVAN et al., Nucleic Acids Research, vol.12:8711-8721.
- BERBAL, 1984 (A CHERCHER S.V.P.).
- BECHTOLD et al. (1993), Comptes rendus Académie des
Sciences Paris Serie 3,316:1194-1199
- BOUCHEZ D., Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III
20 Sciences de la Vie, 1993 316:10, 1188-1193.
- BONELLO et al., 2000, Gene, 246 : 219-227
- BROEKAERT WF et al., Critical Reviews in Plant Sciences, 1997,
16 :3, 297-323 .
- BRADLEY, D., CARPENTER, R., SOMMER, H., HARTLEY, N. ET
25 COEN, E.S. (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result
from opposite orientations of a transposon at the plena locus of
Antirrhinum. Cell 72: 85-95.
- BATE N, TWELL D. Functional architecture of a late pollen promoter:
pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple

stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 37:859-869 (1998).

- **BEAUCAGE et al.**, (1981), *Tetrahedron Lett.*, vol.22: 1859-1862.
- **BECHTOLD et al.** 1993, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III Sciences de la Vie*.316:10, 1194-1199.
- **BURR, B. et BURR, F.A.** (1991). Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends Genet* 7: 55-60.
- **BROWN et al.**, (1979), *Methods Enzymol.*, vol.68: 109-151.
- 10 • **CARRINGTON ET FREED. J. VIROL.** (1990), 64(4) :1590-1597
- **CHRISTENSEN et al.** *Plant Mol. Biol.* (1992), 18:675-689.
- **CHUPEAU ET COLL.** *Biotechnology* (1989), 7(5) : 503-508
- **CHRISTENSEN et al.**, 1996, *Transgenic Res.*, vol.5:213-218.
- 15 • **COEN, E.S., ROMERO, J.M. DOYLE, S. Elliot, R., MURPHY, G. et CARPENTER R.**, (1990) . *Floricula: a homeotic gene required for flower development in Antirrhinum majus*. *Cell* 63(1311-1322).
- **COCKCROFT et al**, *Nature*, 2000, 405, 575-579
- **CHEN ET BUSCH**, *Plant Physiol.*,1999, 115, 1127-1134
- 20 • **DATLA et al.** *Biotechnology Ann. Rev.* (1997), 3: 269-296
- **DENNIS et al.**, 1984, *Nucleic Acids Research*, vol.12:3983-4000
- **DEPIGNY-THIS et al.** *Plant Mol. Biol.* (1992), 20: 267-479.
- **DONALD RGK, Cashmore AR.** Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J* 9:1717-1726 (1990).
- 25 • **ELMAYAN T, TEPFER M.** Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res* 4:388-396 (1995).
- **ELROY-STEIN ET AL.** *PNAS USA* (1989), 86 : 6126-6130
- 30 • **ELLIS J.G. TOKUHISA** , *Plant Journal*, 1993., 4:3, 433-443, 46.

- **FENG-SHAO ET AL.**, 1999, *Biochimica et Biophysica Acta*, Protein Structure and Molecular Enzymology, 1430 : 2, 262-268
- **FINER J.** (1992) *Plant Cell Report*, 11:323-328.
- **FRANCK ET AL.** (1980), *Cell*, 21:285-294
- 5 • **FROMM M. et al.** (1990), *Biotechnology*, 8:833-839
- **FISCHER ET AL.**, *Trends in Plant Science*, 1998, 3, 188-195
- **FULLER SA et al.**, (1996), *Immunology In Current Protocols in Molecular Biology*, AUSUBEL et al. , Eds, John Wiley and Sons, Inc., USA.
- 10 • **GAIT (ed.)**, (1984). *Nucleic Acid Hybridization*.
- **GAUBIER et al.** *Molecular and General Genetics* (1993), 238: 409-418
- **GLOVER (ed.)**, 1985. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II Oligonucleotide Synthesis, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K.
- 15 • **GAI et al**, *Nucl. Acids Res.*, 2000, 28, 94-96
- **GUILIANO et al.**, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7089-7093.
- **GERDES J.T. Tracy WF.** 1993 - *Crop Sci.* 33. 334-337.
- **GALLIE et al.** *Molecular Biology of RNA* (1989), 237-256
- **GOMEZ E, Royo J. Davila J and Hueros G** (1999) Isolation of a
20 putative transcriptional activator, ZmMRP-1, specifically expressed at
the transfer cells of maize; 41st Annual Maize Genetics Conference,
Lake Geneva, WI.
- **GOMEZ E, ROYO J., Davila J Barrero C and Hueros G** (2001). A
transfer cell myb-regulated gene activates the expression of previously
25 described transfer cell specific genes. 43 rd Annual Maize Genetics
Conference, Lake Geneva, WI.
- **GUERCHE ET AL.** (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 206:382
- **HIGGINS T.J.V et al.**, *Plant Science*, 74 (1991), 89-98

- HAWKESFORD *et al.*, Journal of Experimental Botany 2000, 342, 131-134
- HANAHAN D Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.K. Mol. Biol. 1983, June 5:166(4):557-80
- 5 • HAMES and HIGGINS, 1984 (A CHERCHER S.V.P.)
- HEIDEKAMP F. *et al.*, 1983, *Nuc Acids Res* 11, 6211-6223
- HUEROS *et al.* (1999b), *Plant Physiology*, vol.121: 1143-1152
- HUEROS *et al.*, (1995), *The Plant Cell*, vol.7:747-757
- HUEROS *et al.*, (1999a), *Plant Molecular Biology*, vol.41:403-414
- 10 • HAMES AND HIGGINS (eds.), 1985a. *Transcription And Translation*.
- HOUBEN WEIL, (1974).In *Methode der Organischen Chemie*, E.Wunsh ed., volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.
- HINCHEE M. *Plant transformation Plant cell and tissue cultur(e)*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands, 1994.
- 15 • HORSCH R.B. *Commercialization of genetically engineered crops*. The production and uses of genetically transformed plants. Chapman 1 Hall LTD. London UK 19947 , 99-103.
- HAMES BD AND HIGGINS SJ, (1985). *Nucleic acid hybridization : a practical approach*, Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford.
- 20 • HERRMANN A., SCHULZ W., HAHLBROCK K. Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element. *Mol. Gen. Genet.* 212(1):93-98(1988).
- HAJDUKIEWICZ, P. SVAB. Z. AND MALIGA P. *Plant Mol. Biol.* 25 (6), 989-994 (1994)
- 25 • ISHIDA ET AL . *Nature biotechnology* (1996), 14 : 745-750
- ISHIDA ET AL. (1996), *Nature Biotechnology*, vol. 14: 745-750.
- JANG ET AL., *Plant Cell*, 1997, 9, 5-19
- JOBLING ET AL. *Nature* (1987), 325 : 622-625
- JEFFERSON, 1987, *Plant Molecular Biology Reporter*, vol.5:387-405.

- KAMOUN S. ET AL., Mol Plant Microbe Interact, 6(5) : 573-581, Sept-Oct 1993
- KADDICK MX et al., (1998), Nature Biotechnology , vol.16:177-180.
- KAPOOR et al. (1999) , Plant Cell, vol.11:1799-1810.
- 5 • KAY et al. Science (1987), 236:4805.
- KLEIN, (1987). Nature, 327:70-73.
- KIM SY, CHUNG HJ, THOMAS TL. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. Plant J 11: 1237-1251 (1997).
- 10 • KOZBOR et al., (1983), Hybridoma, vol.2 (1):7-16.
- KOHLER G and MILSTEIN C;, (1975), Nature, volume 256:495
- KWON H.B., PARK S.C., PENG H.P., GOODMAN H.M., DEWDNEY J., SHIH M.C. Identification of a light-responsive region of the nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 105(1):357-367(1994).
- 15 • LUSCHER B, EISEMAN RN. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. Genes Dev. 4:2235-2241 (1990) Review.
- 20 • LEGER OJ et al., (1997), Hum Antibodies, vol.8 (1):3-16
- McELROY D. BLOWERS AD, JENES B, WU R,(1991) Field of Botany, Cornell University, ITHACA, NY 14853.
- McELROY et al. Mol. Gen. Genet (1991), 231:150-160.
- MACEJACK et al. Nature (1991), 353 : 90-94
- 25 • MA, Current Biology, 1999, 9, 636-639
- Mc PHERSON, M.J. , QUIRKE, P. et TAYLOR, G.R. (1991) PCR: a practical approach, (Oxford, England Oxford University Press).
- MARTINEAU P et al., (1998), J. Mol. Biol. vol.280(1):117-127.
- MERRIFIELD RB, (1965a), Nature, vol.207 (996):522-523
- 30 • MERRIFIELD RB, (1965b), Science, vol.150 (693):178-185

- **McNELLIS T W**, 1998, The Plant Journal, vol.14 (2): 247-257
- **NEUHAUS ET COLL.** Theoretical and Applied Genet. (1987), 75(1) : 30-36
- **NARANG et al. SA**, (1979), Methods enzymol., vol.68:90-98.
- 5 • **OPSAHL-FERSTAD H.D. et al.**, 1997, The Plant J, 12, 235-246
- **PANABIÈRES F. et al.**, Mol Plant Microbe Interact, 8(6) :996-1003, Nov-Dec, 1995.
- **PIETRZAK M., SHILLITO RD, HOHN T, POTRYKUS I**, 1986, Nucleic Acid Res, 14: 5857-5868.
- 10 •
- **REINA et al.**, NAR, 18: 6426, 1990.
-
- **RIDDER R. et al.**, (1995), Biotechnology (NY), vol.13 (3):255-260.
- **REINMANN KA et al.** (1997), Aids Res. Hum retroviruses, vol.13 (11):933-943.
- 15 •
- **ROBERTS et al.** The Plant Cell (1989), 1: 569-578.
- **SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., and T. Maniatis**, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York.
- 20 • **SCHOCHER ET COLL.** Biotechnology (1986), 4 : 1093-1096
- **SHEEN J.** Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. Plant Cell 3(3):225-245(1991).
- **SCOTT R.J. et al.**, 1998, Development, 125 : 3329-3341
- 25 • **SOLANO R, NIETO C, AVILA J, CANAS L, DIAZ I, PAZ-ARES J.** DUAL DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. EMBO J 14:1773-1784 (1995)
- **SALTER MG et al.**, 1998, vol.16 (1): 127-132
- 30 • **SANCHEZ - PESCADOR R**, 1988, J. Clin. Microbiol. vol.26 (10):1934-1938.
- **STALBERG et al.**, 1996, Planta, 199:515-519.

- **TAKAIWA F., OONO K., WING D., KATO A.** Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol. Biol.* 17:875-885(1991).
- 5 • **URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO S, SHINOZAKI K.** An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5:1529-1539 (1993).
- **URDEA MS et al.** (1991), *Nucleic Acids Simp. Ser.*, vol.24: 197-200.
- **URDEA MS et al;** (1988), *Nucleic Acids Research*, vol.11:4937-4957.
- 10 • **VAIN P et al.,** (1989), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 18: 143-151.
- **VAIN P. et al.,** (1993), *Plant Cell, Tissue Org. Cult.*, vol.33: 237-246
- **WATSON ET AL.** (1994), *ADN recombinant*, Ed. De Boeck Université pp 273-292
- 15 •
- **YANAGISAWA S, SCHMIDT RJ.** Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* 17:209-214 (1999)
- **YANG F. MOSS LG, PHILIPS GN JR.** *Nat. Biotechnol.* 1996 Oct. 20 14(10):1246-51.
- **YANG TT, CHENG L. KAIN SR,** *Nucleic acids Res.* 1996, Novembre 15; 24(22):4592-3.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, ou avec un
5 fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

2. Acide nucléique selon la revendication 1 comprenant un
10 polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID n°3, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15 3. Acide nucléique selon la revendication 1 comprenant un polynucléotide régulateur de l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt chez une plante, ledit polynucléotide régulateur comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la
20 séquence nucléotidique SEQ ID N° 3, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

4. Acide nucléique selon la revendication 1 comprenant un
25 polynucléotide régulateur de l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt chez une plante, ledit polynucléotide régulateur comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 4, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

30

5. Acide nucléique selon l'une des revendications 3 et 4, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide régulateur.

5

6. Acide nucléique selon la revendication 1 comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 5, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

10

7. Acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°9.

15

8. Acide nucléique selon la revendication 7 comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 7, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

20

9. Acide nucléique selon la revendication 1 comprenant un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 6, ou avec un fragment de cette séquence nucléotidique, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

25

10. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N° 10.

30

11. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N° 11.

5

12. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N° 12.

10

13. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15

14. Acide nucléique selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID N° 13 à 17 et 20 à 32.

15. Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 13 et 14, caractérisé en ce qu'il est marqué par une molécule détectable.

20

16. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

25

17. Vecteur recombinant pour l'expression d'un polynucléotide d'intérêt dans la zone de transfert d'un grain de végétal en développement comprenant :

- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 3 et 4 ; et
- b) un polynucléotide d'intérêt placé sous le contrôle de l'acide nucléique défini en a).

30

18. Vecteur recombinant d'expression comprenant :

a) un acide régulateur de l'expression d'un polynucléotide
5 d'intérêt dans un organisme hôte déterminé ; et

b) un polynucléotide d'intérêt constitué d'un acide nucléique
selon l'une des revendications 1 et 6 à 12,
le polynucléotide d'intérêt défini en b) étant placé sous le contrôle de
l'acide nucléique régulateur défini en a).

10

19. Vecteur recombinant selon la revendication 17, caractérisé
en ce qu'il s'agit du vecteur contenu dans la souche *Escherichia coli*
déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le Numéro d'accès I-2567.

15

20. Vecteur recombinant selon la revendication 17, caractérisé
en ce qu'il s'agit du vecteur contenu dans la souche *Escherichia coli*
déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le Numéro d'accès I-2568.

20

21. Cellule hôte transformée par un acide nucléique selon l'une
quelconques des revendications 1 à 15 ou par un vecteur recombinant
selon l'une des revendications 17 à 20.

25

22. Cellule hôte recombinante selon la revendication 21
caractérisée en ce qu'elle est d'origine bactérienne ou végétale.

23. Cellule hôte selon la revendication 21, caractérisée en ce
qu'il s'agit d'une cellule de la souche de *Escherichia coli* déposée à la
CNCM le 4 Octobre 2000 sous le Numéro d'accès I-2567

24. Cellule hôte selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la souche de *Escherichia coli* déposée à la CNCM le 4 Octobre 2000 sous le Numéro d'accès I-2568

5 25. Cellule hôte selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante.

26. Plante transformée par un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 14 ou par un vecteur recombinant selon l'une des
10 revendications 16 à 20.

27. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) obtention d'une cellule hôte recombinante végétale selon
15 l'une des revendications 21 et 24;

b) Régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a) ;

c) Sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 14.

20

28. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* selon la revendication 22 ;

25 b) Transformation d'une plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a) ;

c) Sélection des plantes ayant intégré dans leur génome un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 14.

30 29. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) transfecter une cellule de plante avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 14 ou avec un vecteur recombinant selon l'une des revendications 16 à 20 ;

5 b) régénérer une plante entière à partir des cellules de plante recombinantes obtenues à l'étape a) ;

c) sélectionner des plantes ayant intégré dans leur génome un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 14.

10 30. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 27 à 29, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de :

d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telles qu'obtenues à l'étape c) ;

15 e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

31. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 27 à 29, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de :

20 f) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce ;

g) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé le transgène.

25 32. Plante transgénique, telle qu'obtenue selon le procédé selon l'une des revendications 27 à 31.

33. Semence d'une plante transgénique selon la revendication 32.

30 34. Polypeptide codé par un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 et 15 à 30.

35. Polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°9 ou polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°9, ou un fragment ou un variant de celui-ci.

36. Polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°10 ou polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°10 ou un fragment ou un variant de celui-ci.

37. Polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°11 ou polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°11 ou un fragment de celui-ci.

38. Polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°12 ou polypeptide possédant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°12 ou un fragment de celui-ci.

39. Anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38.

40. Procédé pour détecter la présence d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38 dans un échantillon comprenant les étapes de :

- a) mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 39 ;
- b) détection du complexe antigène/anticorps formé

42. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 5 pour l'obtention d'une plante transformée à qualité agronomique, alimentaire ou industrielle améliorée.

5 41. Nécessaire ou kit pour la détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38 dans un échantillon, comprenant :

 a) un anticorps selon la revendication 39 ;

 b) le cas échéant, un ou plusieurs réactifs nécessaires à la détection du complexe antigène/anticorps formé.

10 42. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 5 pour l'obtention d'une plante transformée à qualité agronomique, alimentaire ou industrielle améliorée.

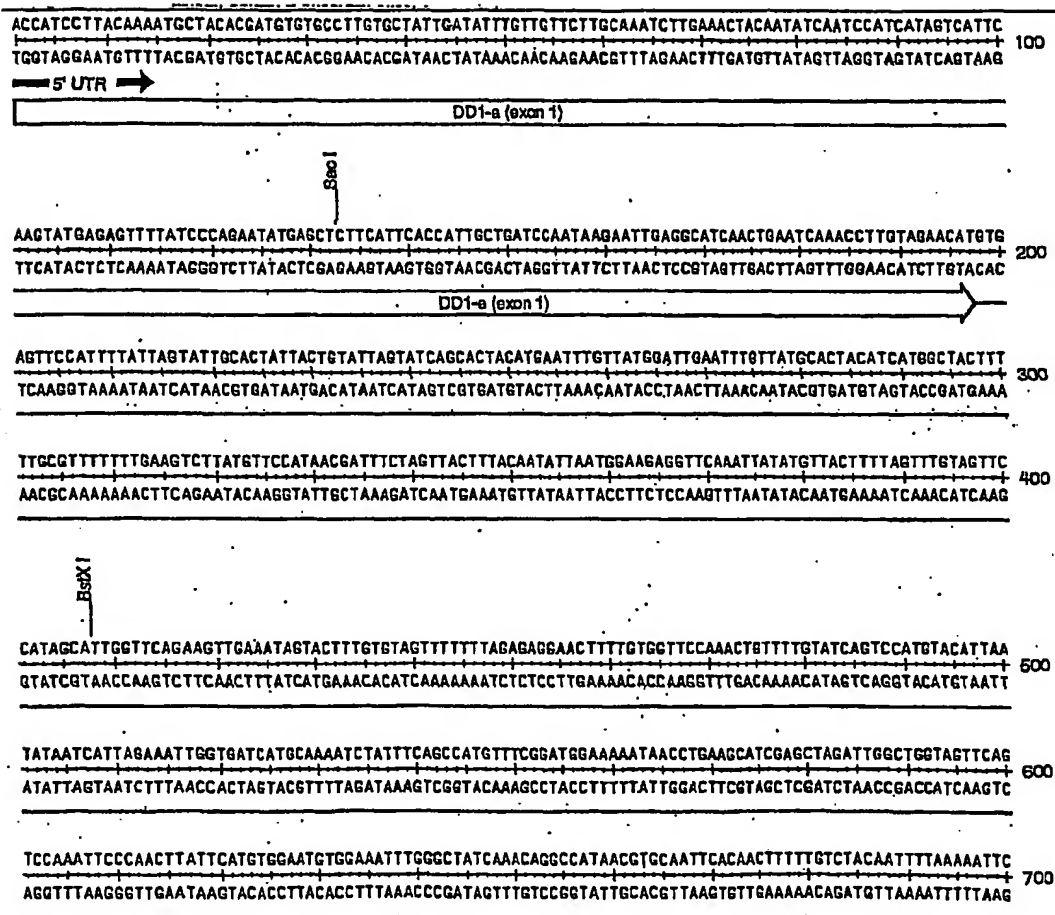


FIGURE 1

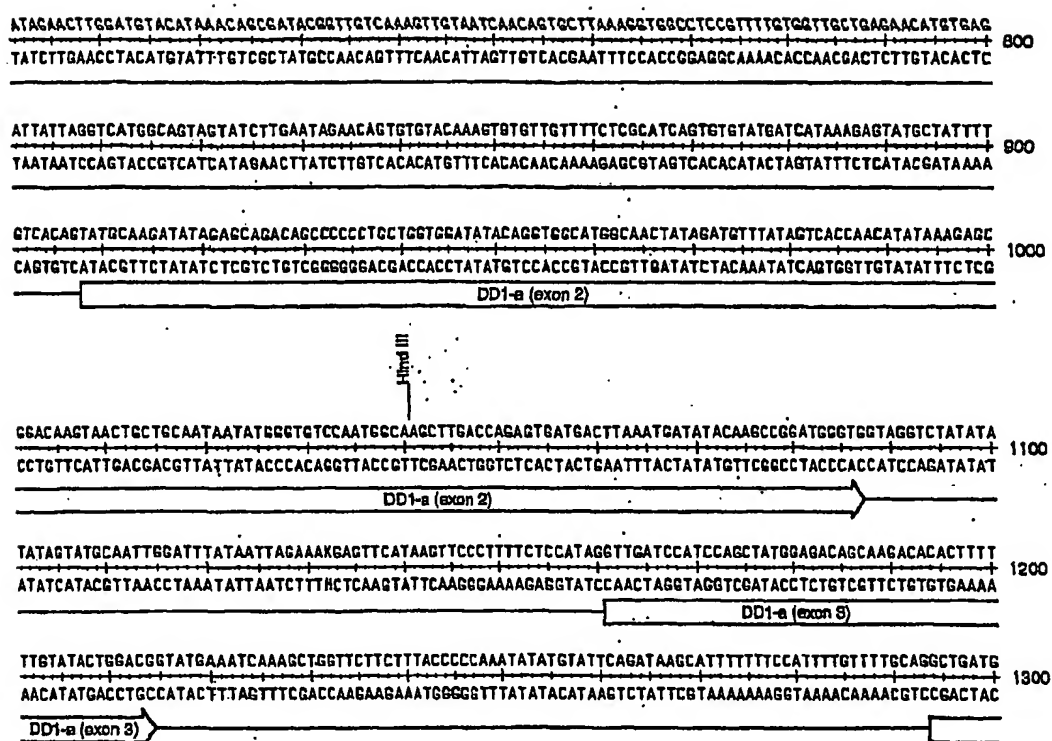


FIGURE 1 (Suite 1)

3/28

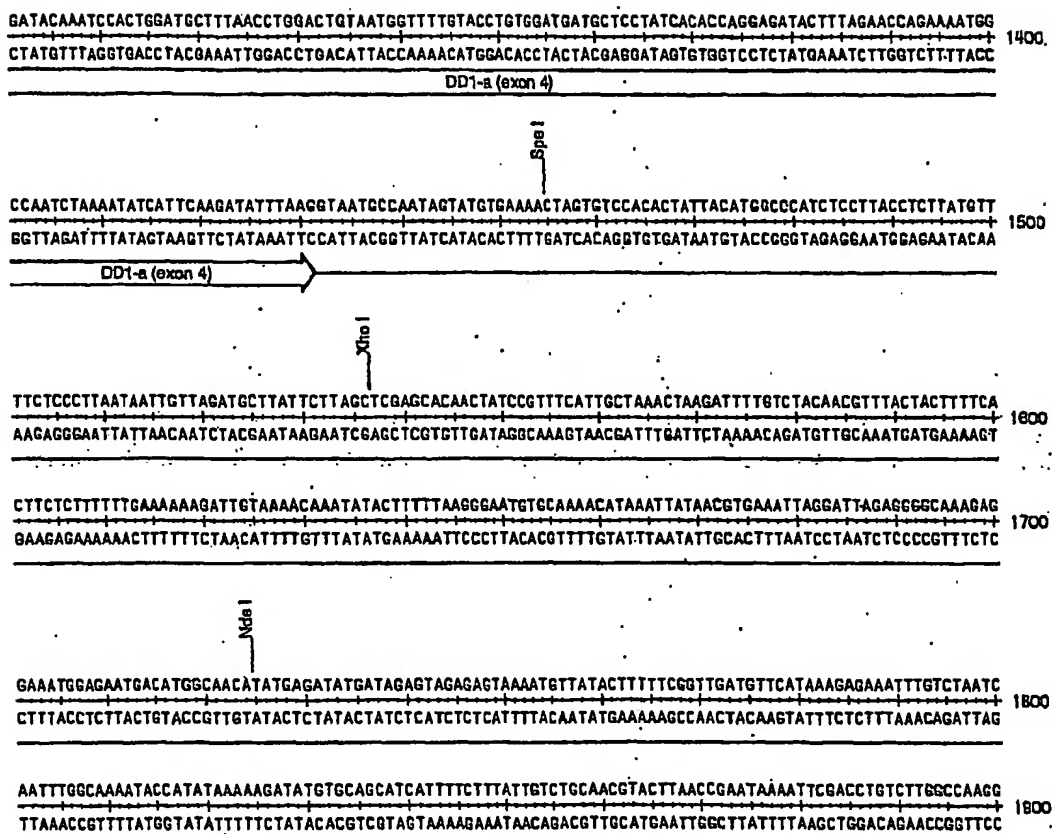


FIGURE 1 (Suite 2)

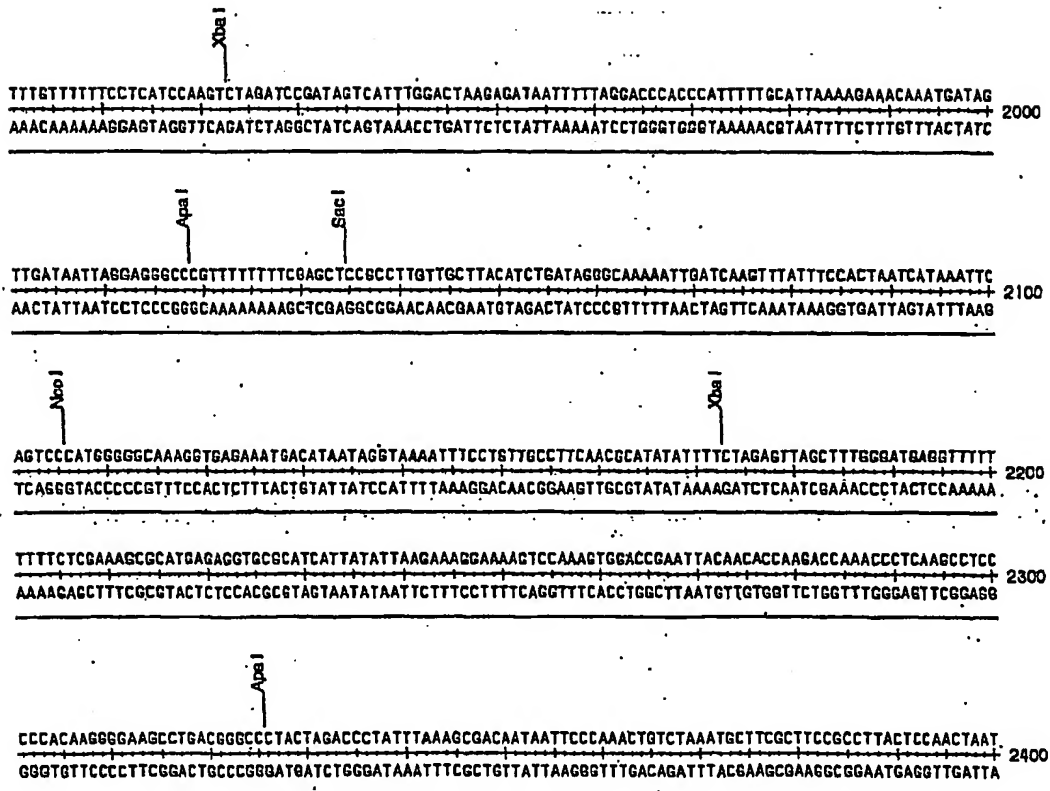


FIGURE 1 (Suite 3)

5/28

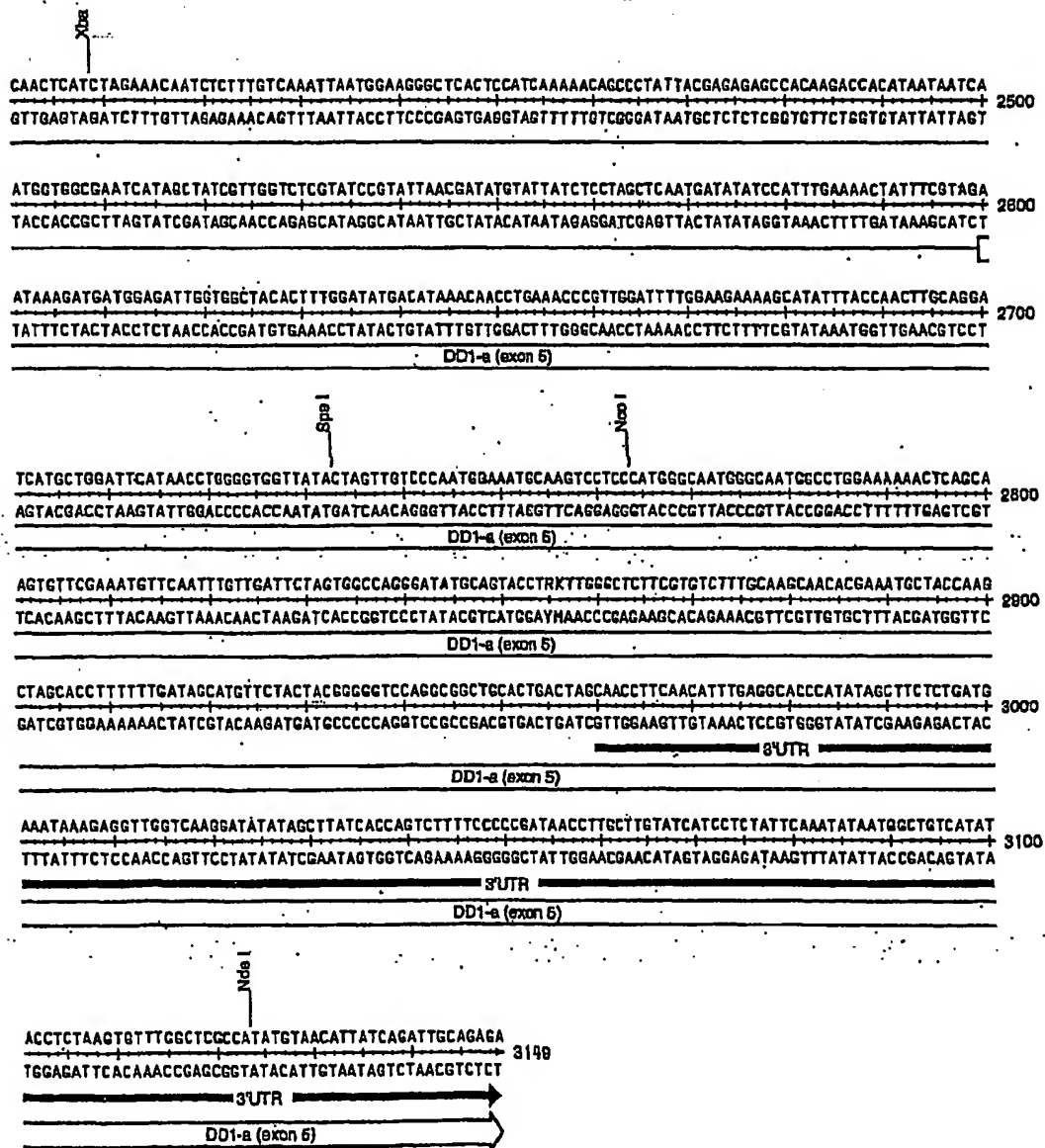


FIGURE 1 (Suite 4)

6/28

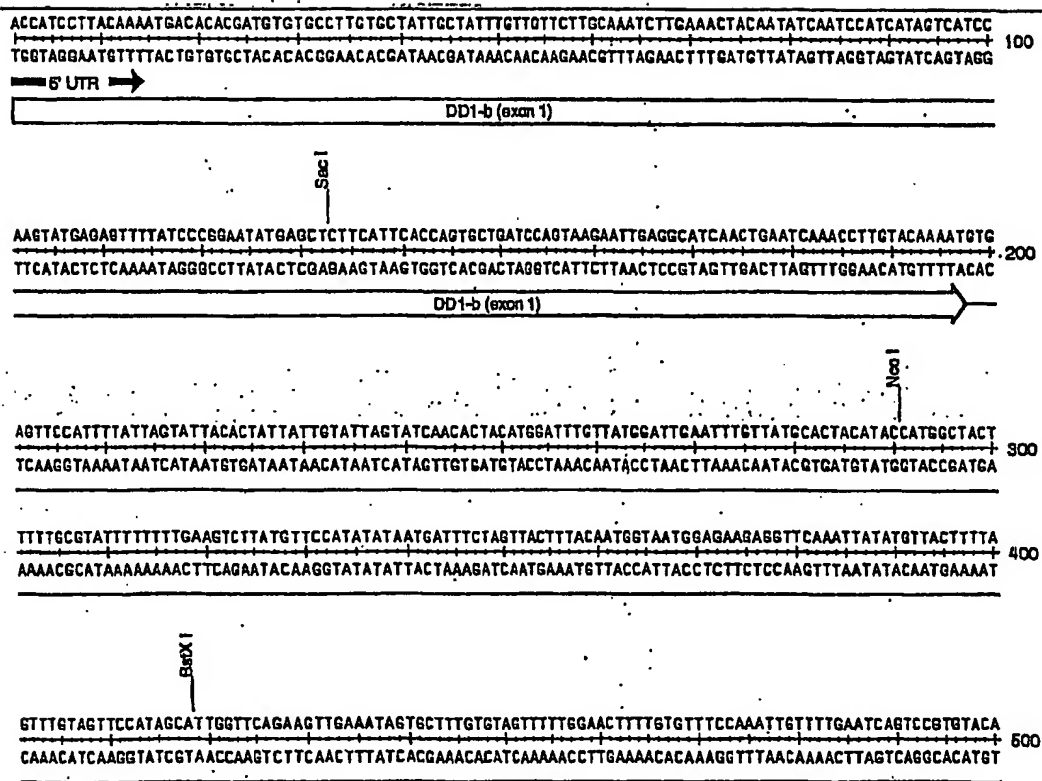


FIGURE 2

7/28

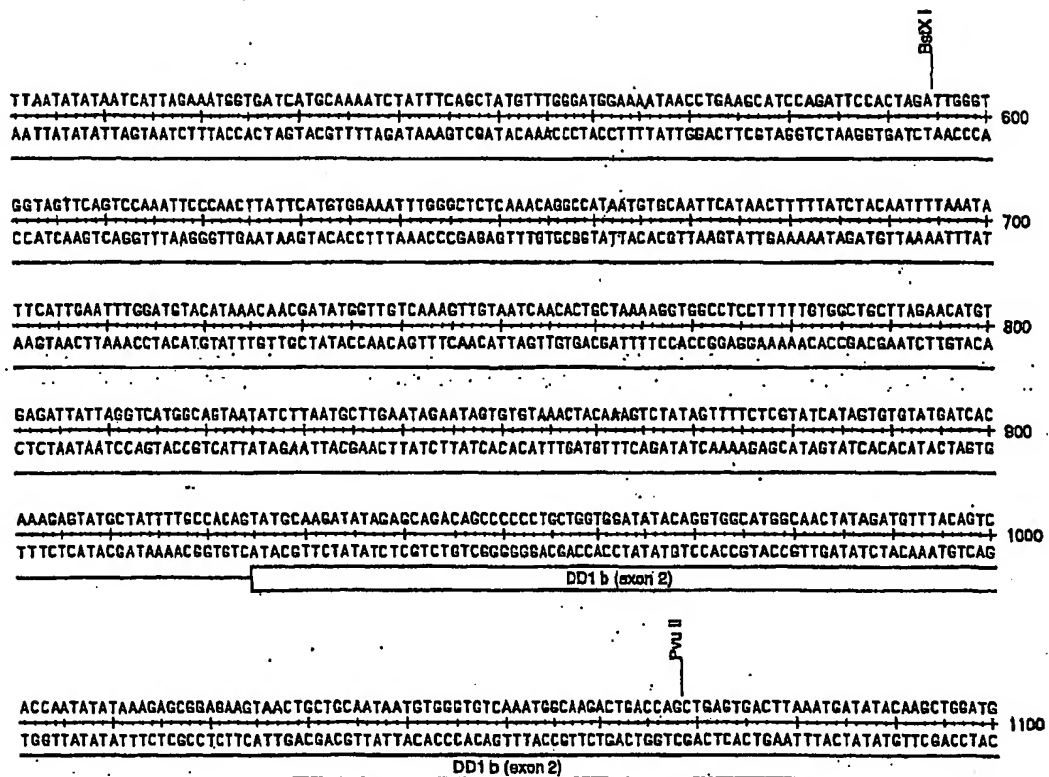


FIGURE 2 (Suite 1)

8/28

Pag

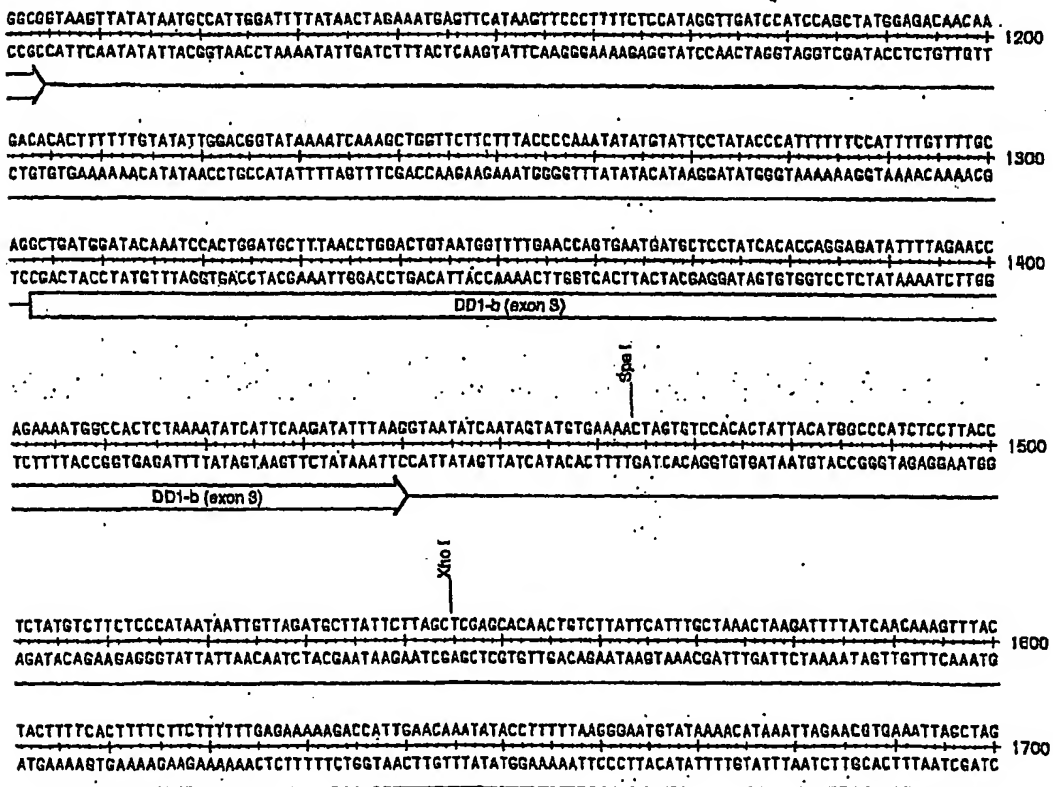


FIGURE 2 (Suite 2)

9/28

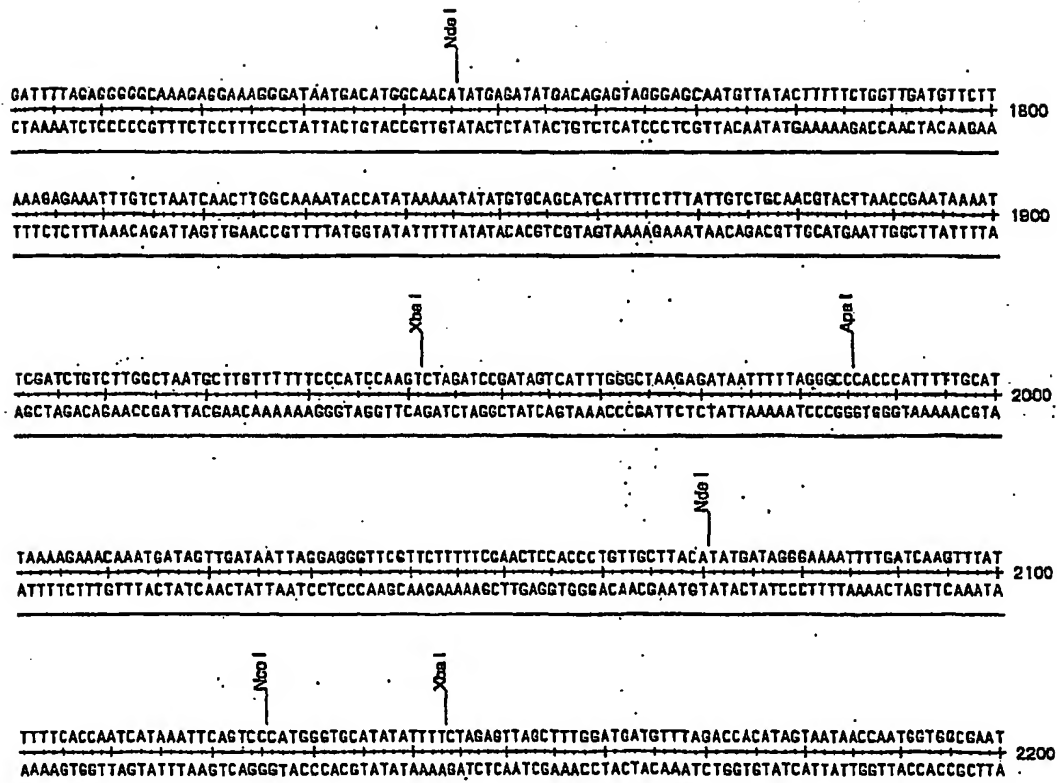


FIGURE 2 (Suite 3)

10/28

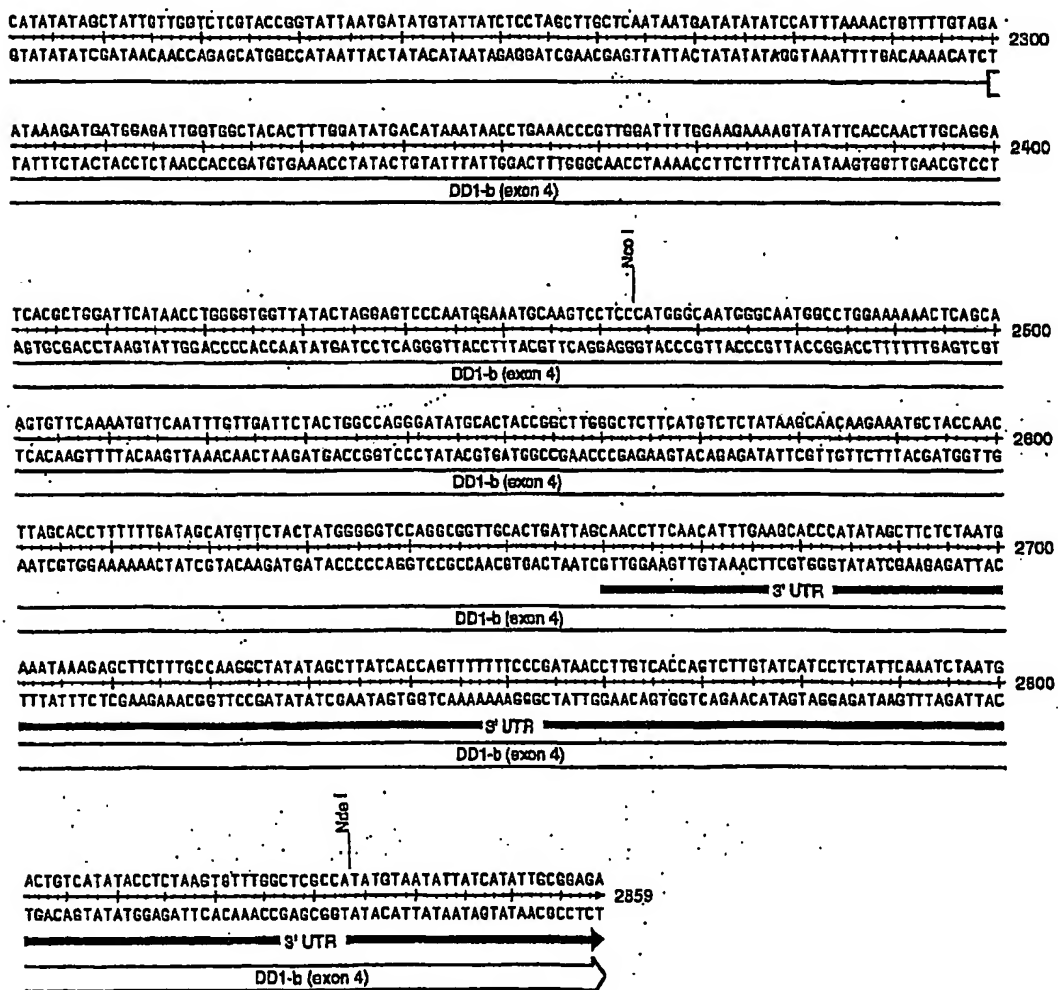


FIGURE 2 (Suite 4)

11/28

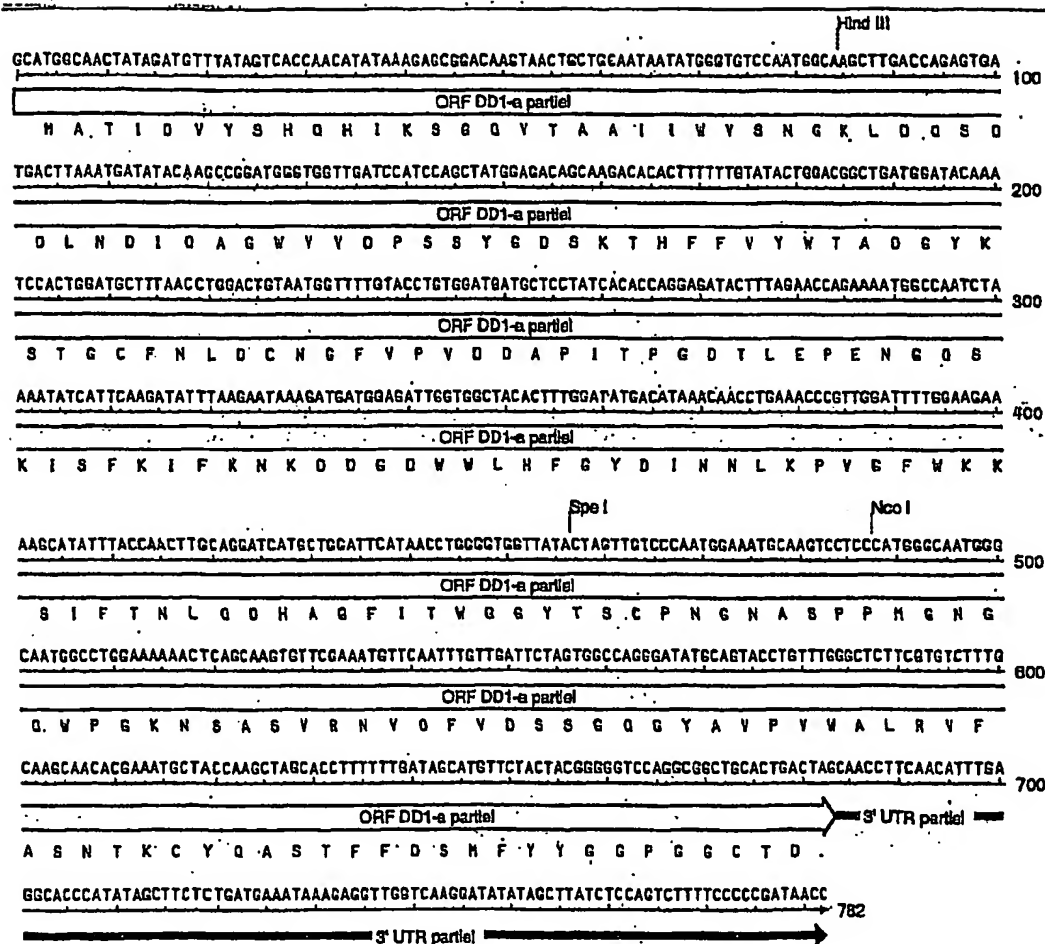


FIGURE 3.

12/28

Page 1

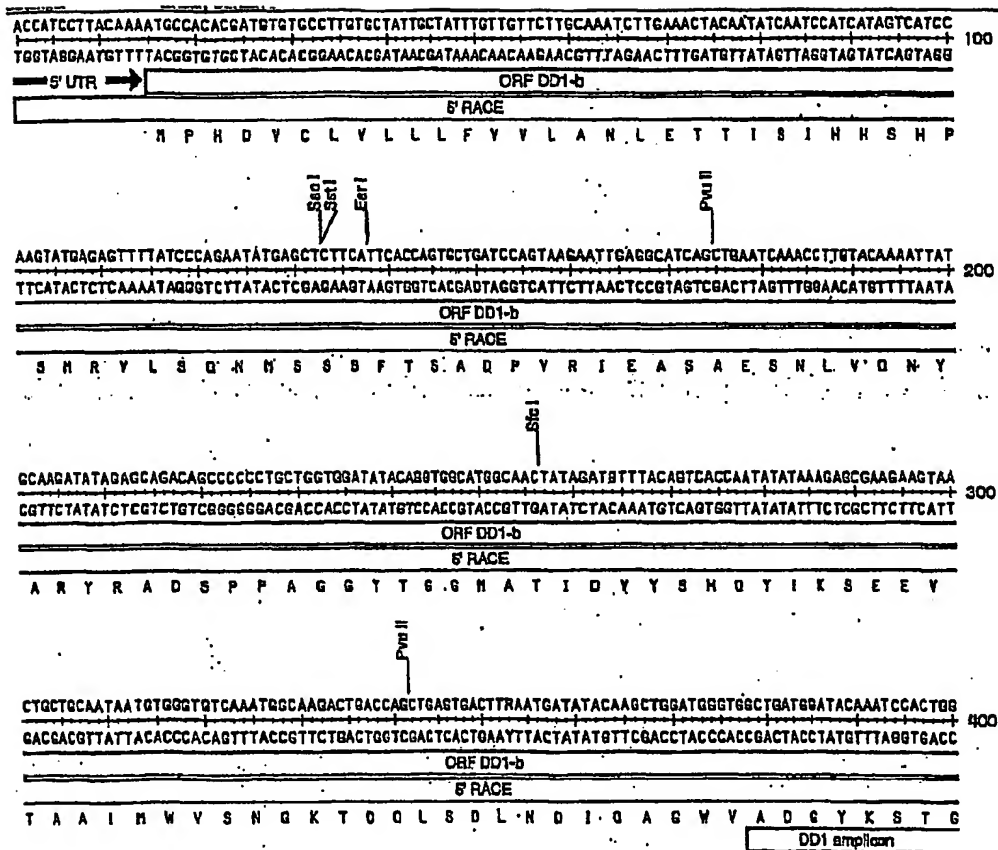


FIGURE 4

13/28

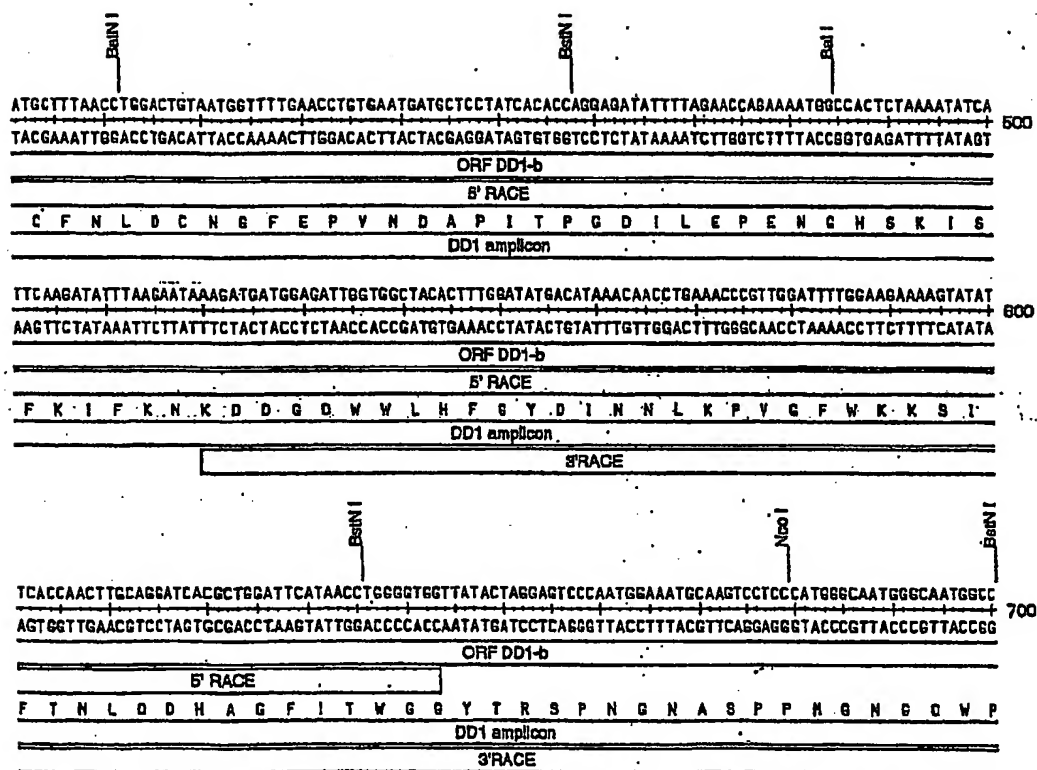


FIGURE 4 (Suite 1)

14/28

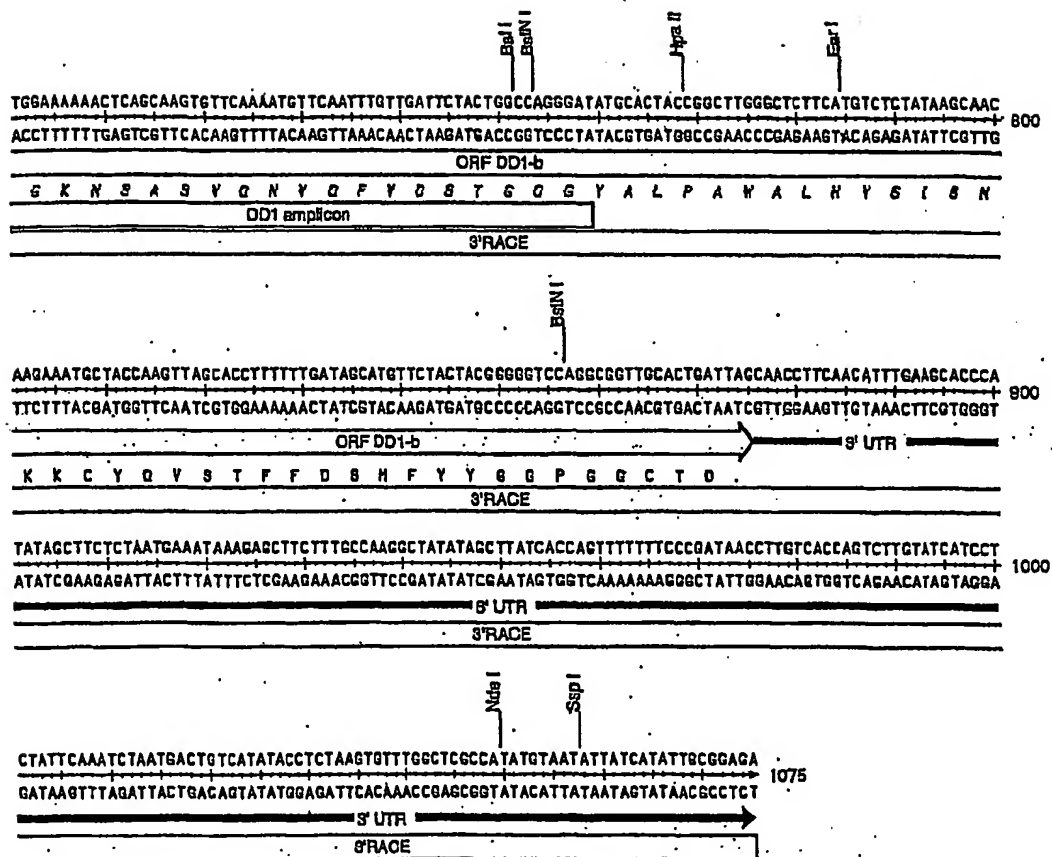


FIGURE 4 (Suite 2)

15/28

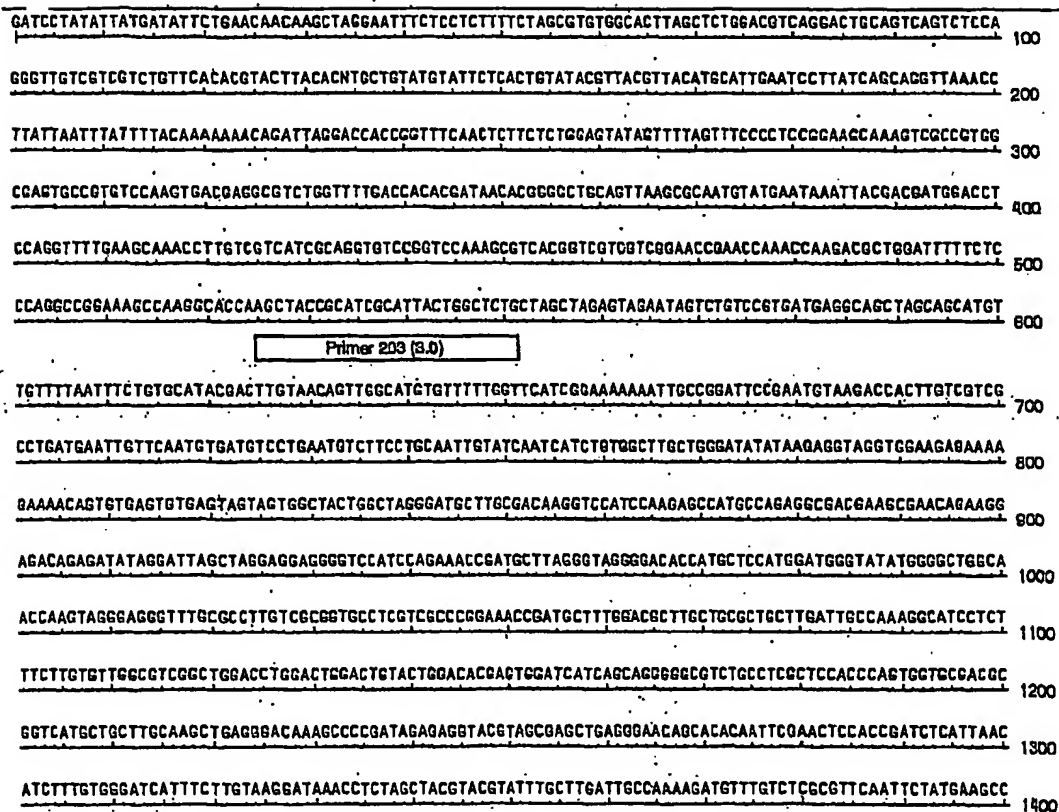


FIGURE 5

16/28

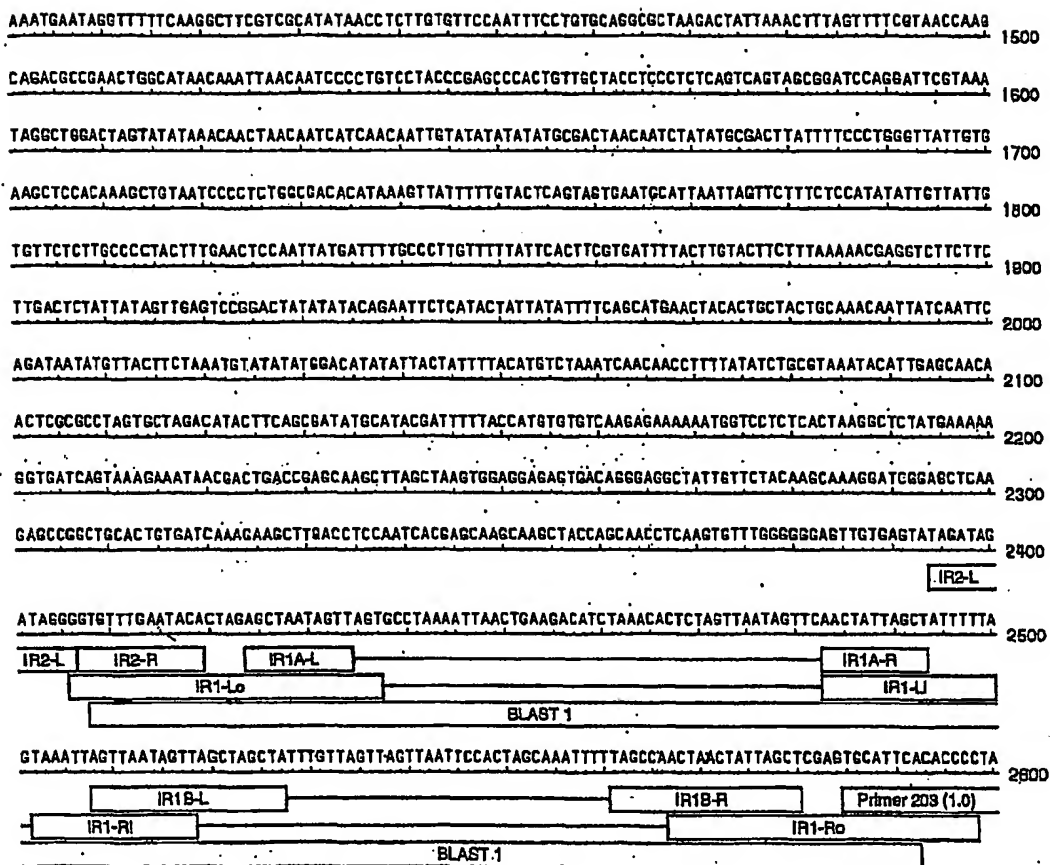


FIGURE 5 (Suite1)

17/28

Page 2

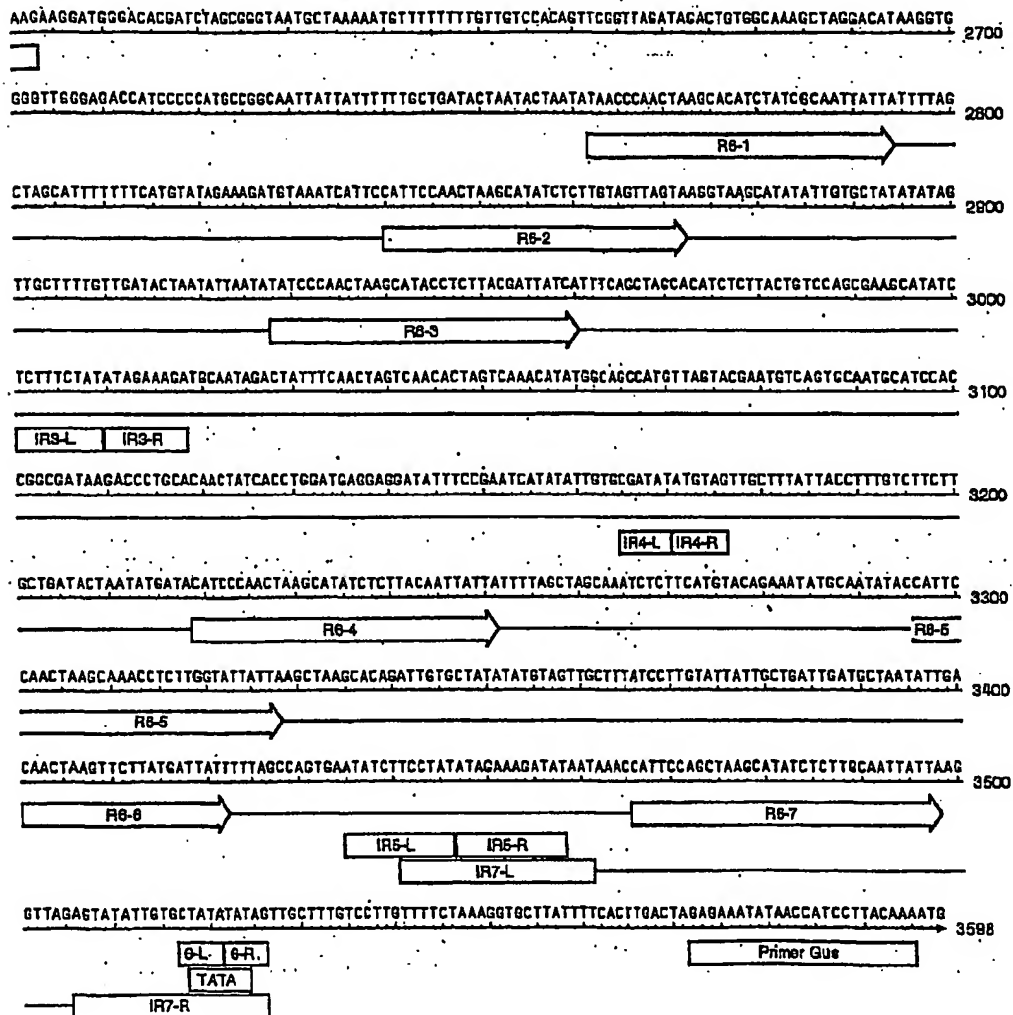


FIGURE 5 (Suite 2)

18/28

Page 1

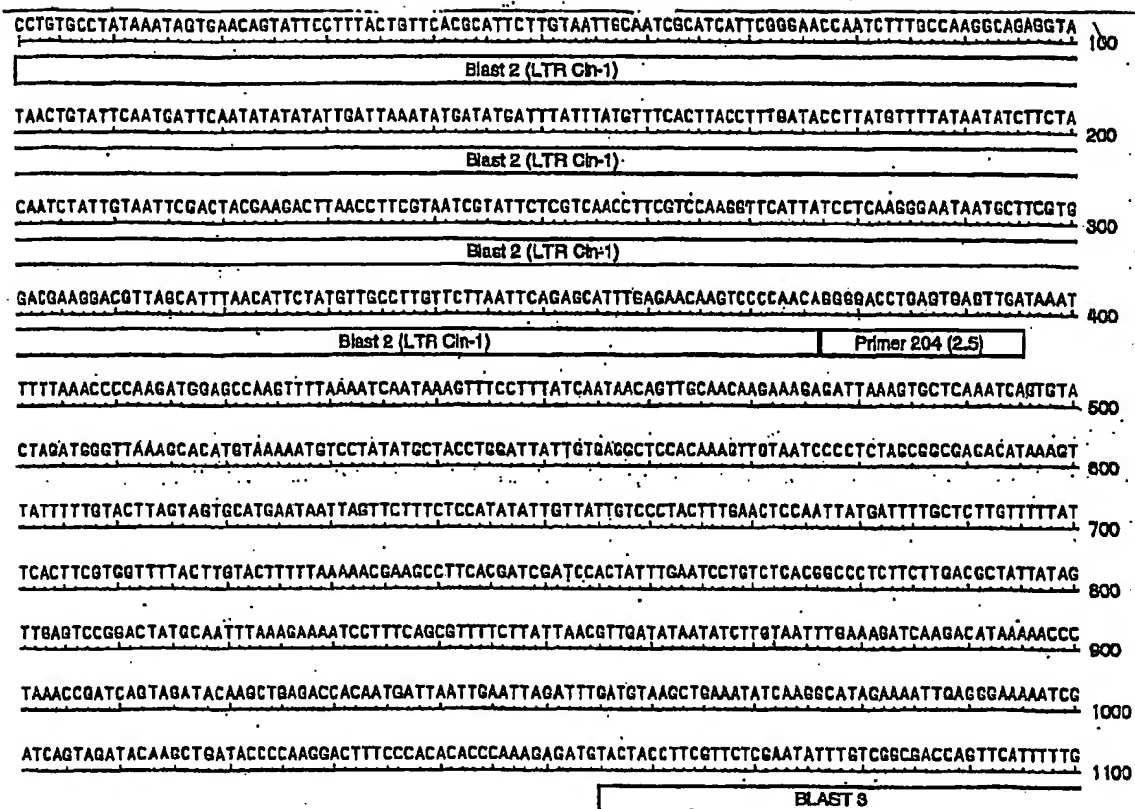


FIGURE 6

19/28

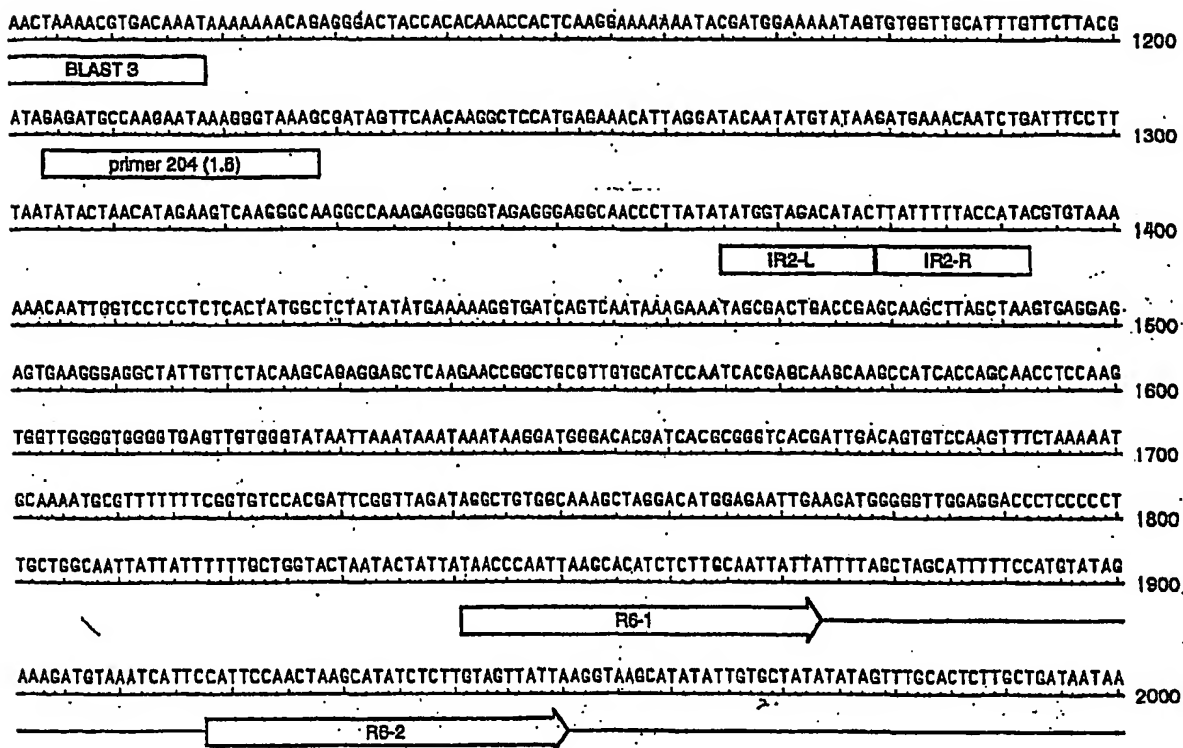


FIGURE 6 (Suite 1)

20/28

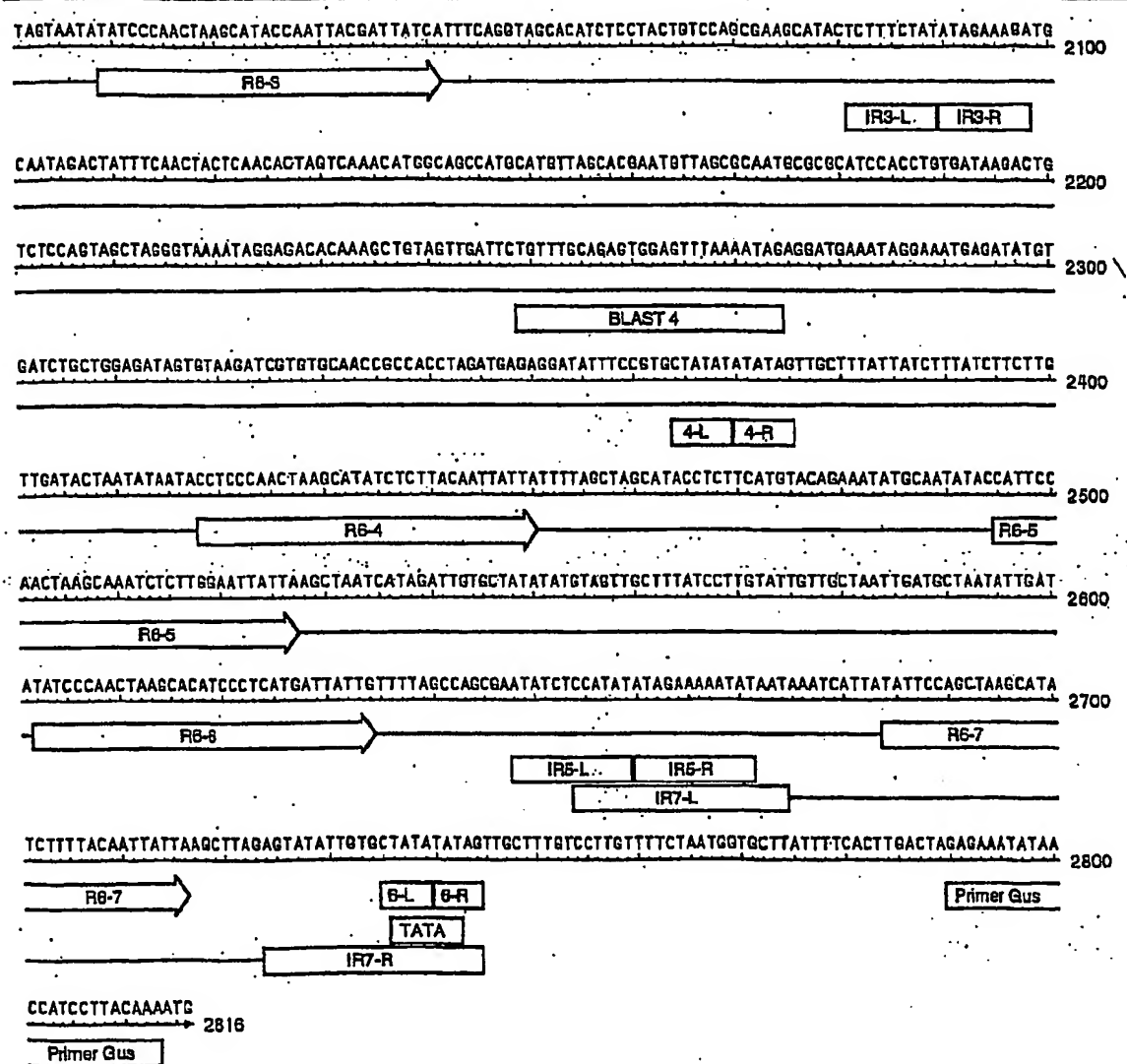


FIGURE 6 (Suite 2)

21/28

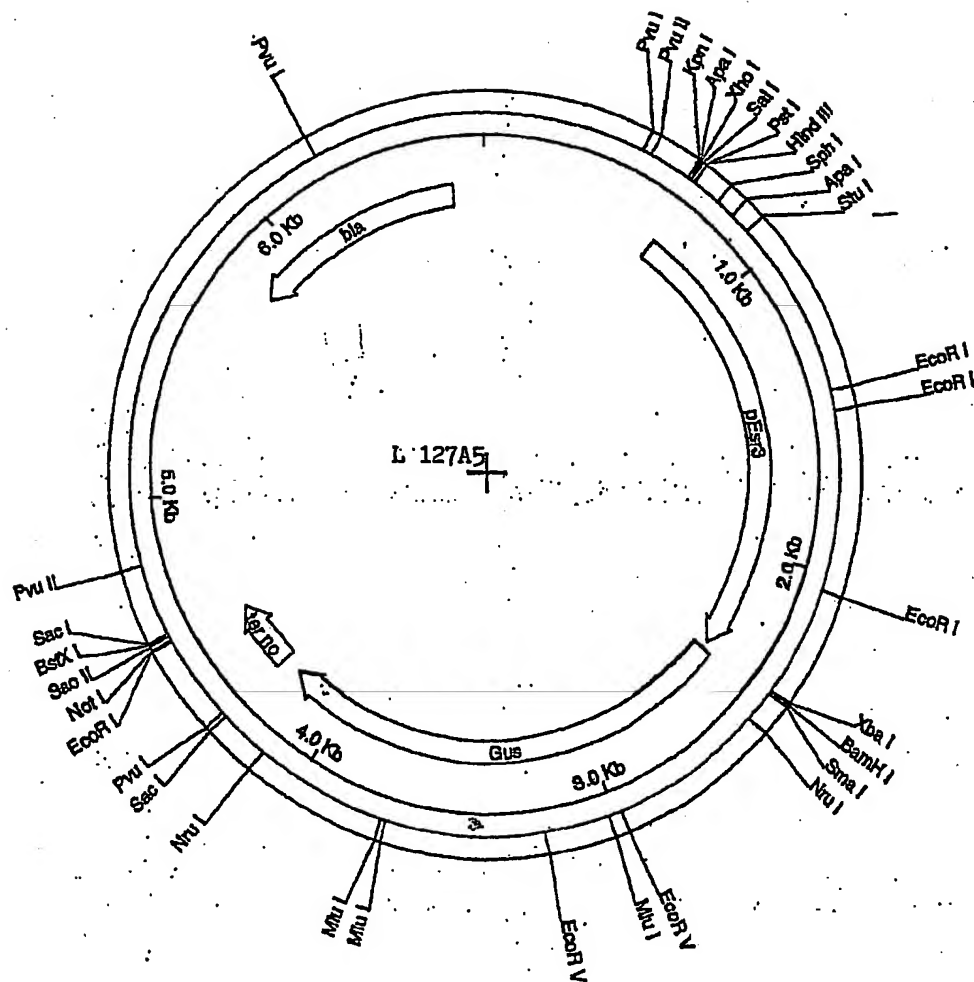


FIGURE 7

22/28

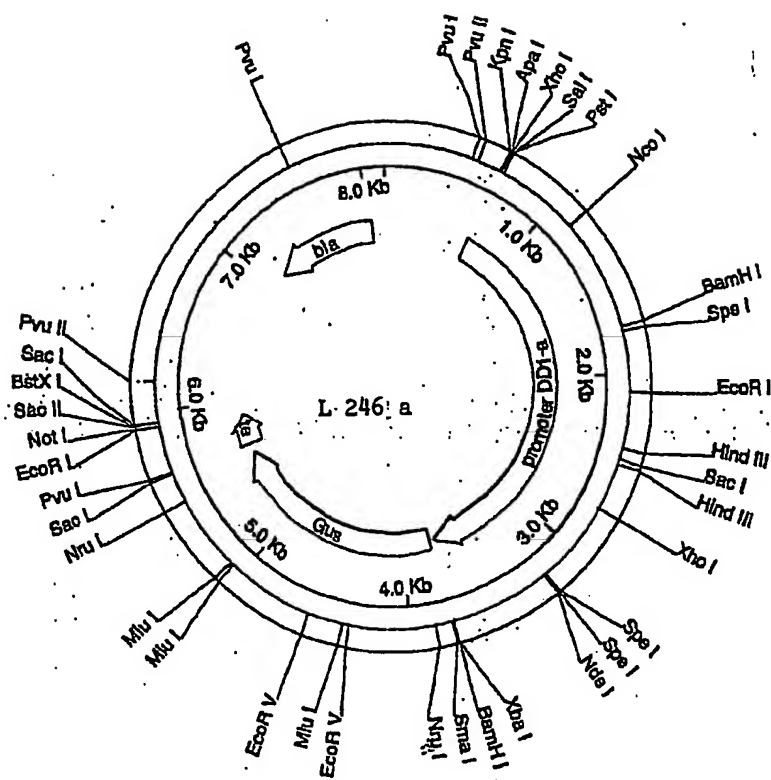


FIGURE 8

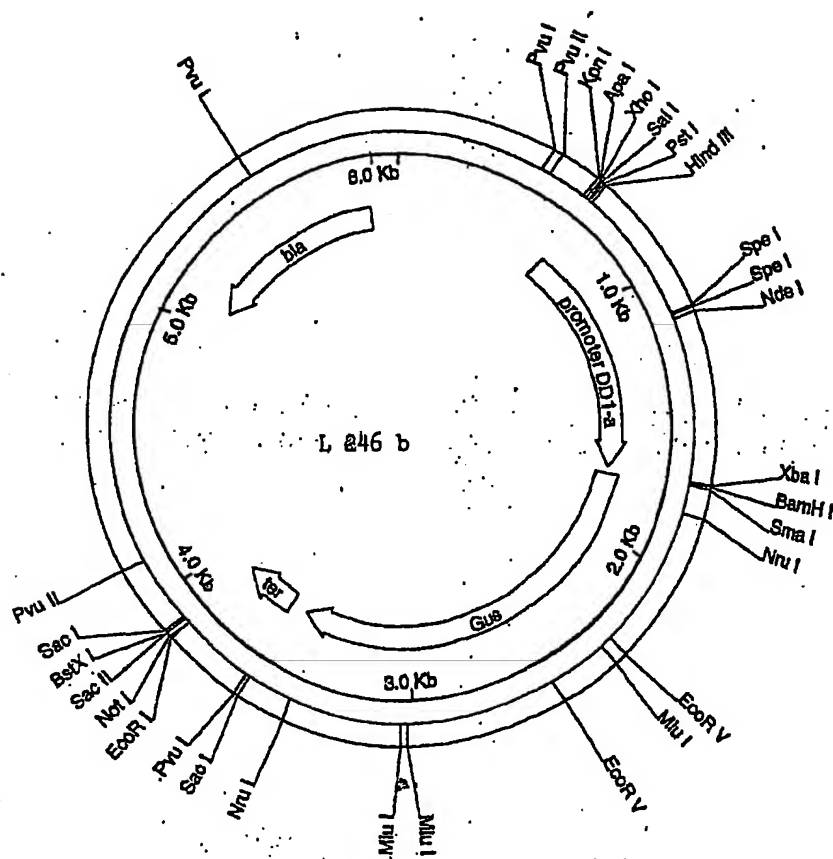


FIGURE 9

24/28

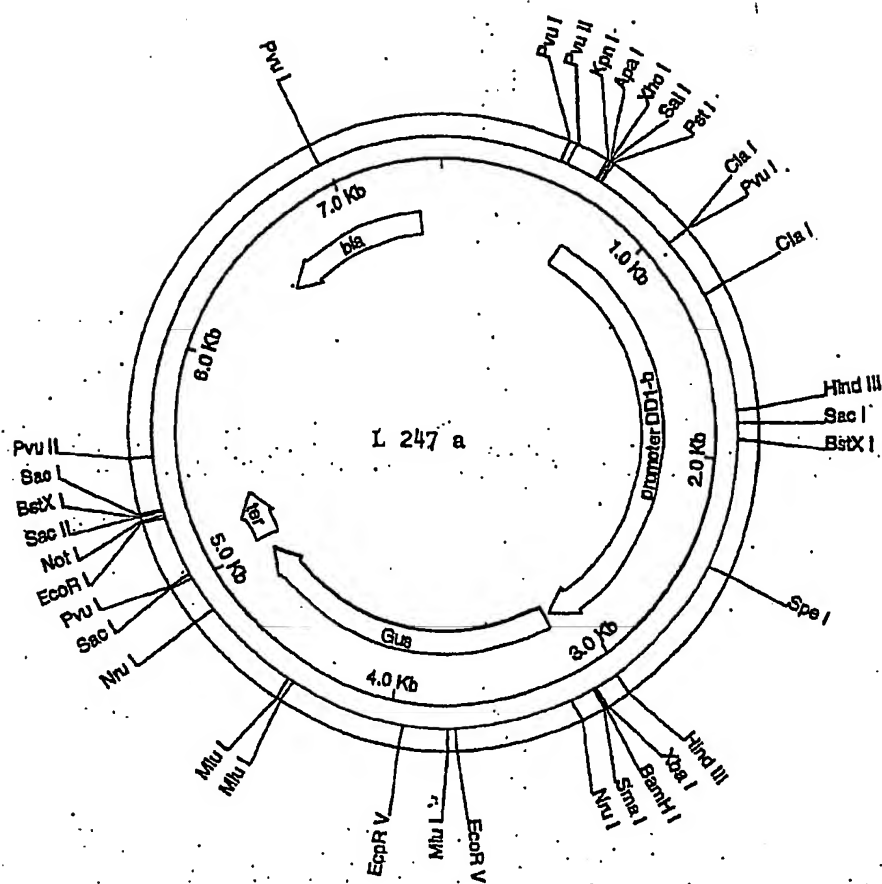


FIGURE 10

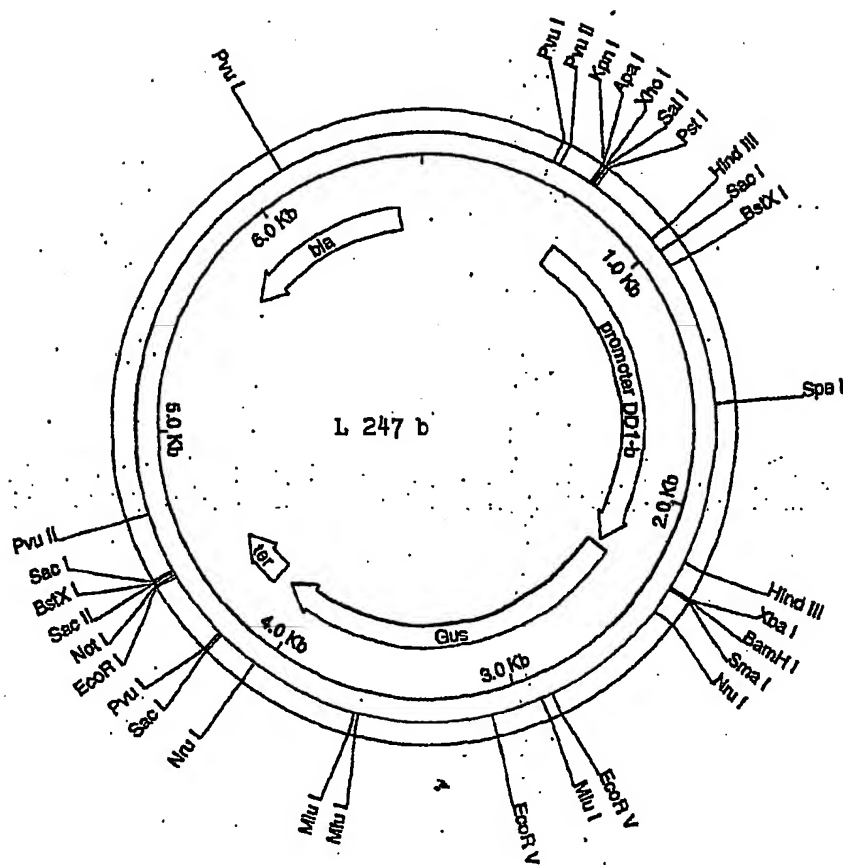


FIGURE 11

26/28

		MKHDVCLVLLFFVVLANLETTTSTHSHSPMRVLSNMSSSFSADEFVREASTESNLWQ						
		10	20	30	40	50	60	
1		MKHDVCLVLLFFVVLANLETTTSTHSHSPMRVLSNMSSSFSADEFVREASTESNLWQ						DD1-a
1		MKHDVCLVLLFFVVLANLETTTSTHSHSPMRVLSNMSSSFSADEFVREASTESNLWQ						DD1-a
1		MKHDVCLVLLFFVVLANLETTTSTHSHSPMRVLSNMSSSFSADEFVREASTESNLWQ						DD1-b
1		MKHDVCLVLLFFVVLANLETTTSTHSHSPMRVLSNMSSSFSADEFVREASTESNLWQ						DD1-b
		NYARTRADSPFAGGYTGGMATLDVYSHQIKSGVIAATLWENGKLDQSLNDIQAGW						
		70	80	90	100	110	120	
1		NYARTRADSPFAGGYTGGMATLDVYSHQIKSGVIAATLWENGKLDQSLNDIQAGW						DD1-a
61		NYARTRADSPFAGGYTGGMATLDVYSHQIKSGVIAATLWENGKLDQSLNDIQAGW						DD1-a
61		NYARTRADSPFAGGYTGGMATLDVYSHQIKSGVIAATLWENGKLDQSLNDIQAGW						DD1-b
61		NYARTRADSPFAGGYTGGMATLDVYSHQIKSGVIAATLWENGKLDQSLNDIQAGW						DD1-b
		VVDPSYSGDSRTHFFVYWTADGYKSTGCFNLDCNGFVVDAPITRGDLEPENGSKIS						
		130	140	150	160	170	180	
43		VVDPSYSGDSRTHFFVYWTADGYKSTGCFNLDCNGFVVDAPITRGDLEPENGSKIS						DD1-a
121		VVDPSYSGDSRTHFFVYWTADGYKSTGCFNLDCNGFVVDAPITRGDLEPENGSKIS						DD1-a
121		VVDPSYSGDSRTHFFVYWTADGYKSTGCFNLDCNGFVVDAPITRGDLEPENGSKIS						DD1-b
121		VVDPSYSGDSRTHFFVYWTADGYKSTGCFNLDCNGFVVDAPITRGDLEPENGSKIS						DD1-b
		FKIFRNKDDGDWLEFGYDINLKPVGFWKKSIFINLQHAGFTWGGYTSSENGNASPP						
		190	200	210	220	230	240	
103		FKIFRNKDDGDWLEFGYDINLKPVGFWKKSIFINLQHAGFTWGGYTSSENGNASPP						DD1-a
181		FKIFRNKDDGDWLEFGYDINLKPVGFWKKSIFINLQHAGFTWGGYTSSENGNASPP						DD1-a
163		FKIFRNKDDGDWLEFGYDINLKPVGFWKKSIFINLQHAGFTWGGYTSSENGNASPP						DD1-b
163		FKIFRNKDDGDWLEFGYDINLKPVGFWKKSIFINLQHAGFTWGGYTSSENGNASPP						DD1-b
		MNGQWFGKNSASVQNVQFVDSGGGYAVFPAWALHVEASNTKCYQASTFFDSMFYTGCG						
		250	260	270	280	290	300	
163		MNGQWFGKNSASVQNVQFVDSGGGYAVFPAWALHVEASNTKCYQASTFFDSMFYTGCG						DD1-a
241		MNGQWFGKNSASVQNVQFVDSGGGYAVFPAWALHVEASNTKCYQASTFFDSMFYTGCG						DD1-a
223		MNGQWFGKNSASVQNVQFVDSGGGYAVFPAWALHVEASNTKCYQASTFFDSMFYTGCG						DD1-b
223		MNGQWFGKNSASVQNVQFVDSGGGYAVFPAWALHVEASNTKCYQASTFFDSMFYTGCG						DD1-b
		GCID-						
223		GCID-						DD1-a
301		GCID-						DD1-a
283		GCID-						DD1-b
283		GCID-						DD1-b

FIGURE 12

27/28

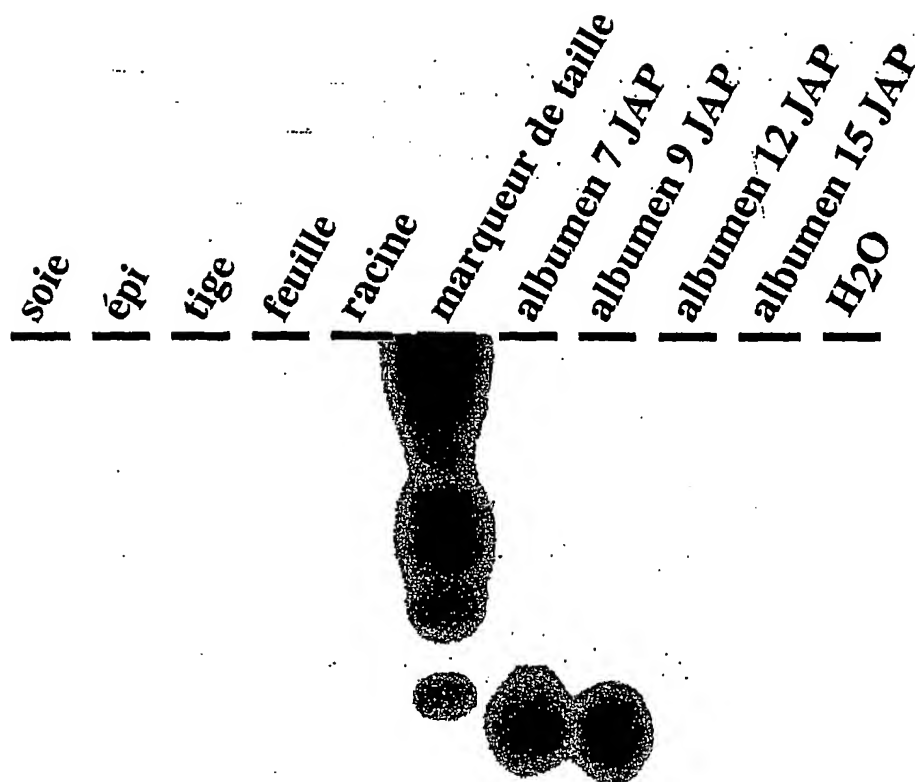


FIGURE 13

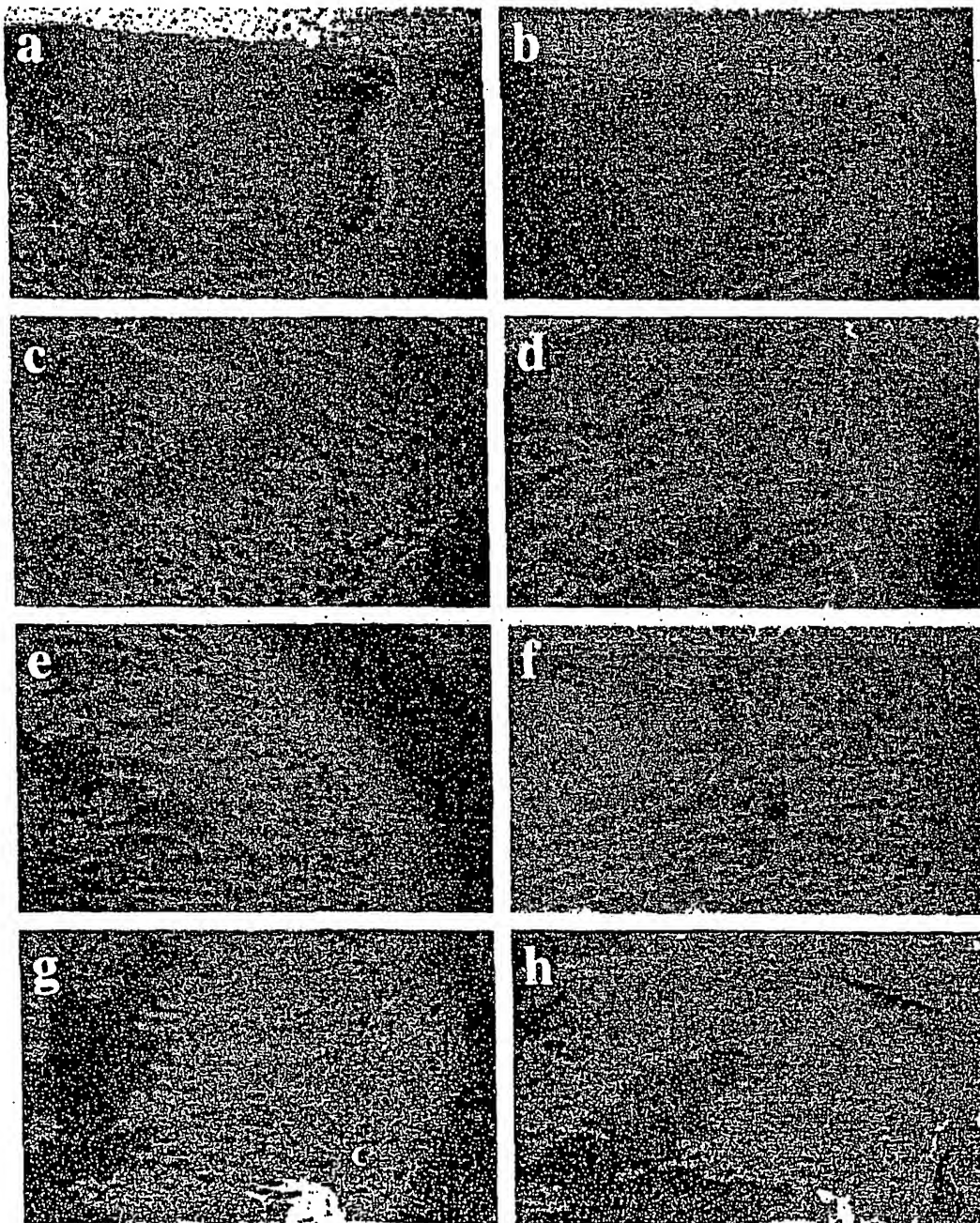


FIGURE 14

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/036788 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/29, C07K 14/415, C12N
15/82, 5/10, A01H 5/00, C07K 16/16

LYON (FR). **MAGNARD, Jean-Louis** [FR/FR]; 1 avenue Charles André, F-69230 ST. GENIS LAVAL (FR).
PEREZ, Pascual [FR/FR]; 17 chemin de la Pradelle, Varenne, F-63450 CHANONAT (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03439

(74) Mandataires : **CATHERINE, Alain** etc.; Cabinet HARLE et PHELIP, 7 rue de Madrid, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international :

6 novembre 2001 (06.11.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/14214 6 novembre 2000 (06.11.2000) FR
00/16602 19 décembre 2000 (19.12.2000) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 25 septembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147 rue de l'Université, F-75338 PARIS cedex 07 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS cedex 16 (FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON (ENSL) [FR/FR]; 46 allée d'Italie, F-69364 LYON cedex 07 (FR). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON (UCBL) [FR/FR]; Maison Condorcet, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 VILLEURBANNE cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **RO-GOWSKY, Peter** [DE/FR]; 31 rue André Bollier, F-69007

(54) Title: NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES SPECIFICALLY EXPRESSED IN CELLS OF THE TRANSFER ZONE OF A PLANT SEED AND USES THEREOF

(54) Titre : ACIDES NUCLEIQUES ET POLYPEPTIDES EXPRIMÉS SPÉCIFIQUEMENT DANS LES CELLULES DE LA ZONE DE TRANSFERT D'UN GRAIN DE PLANTE ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns nucleic acids specifically expressed in the transfer zone of a plant seed, preferably nucleic acids constituting DD1-a and DD1-b genes of corn. The invention also concerns recombinant cloning and/or expression vectors comprising a nucleic acid of the invention and host cells transformed by a nucleic acid or a recombinant vector of the invention, in particular host cells of plant origin.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des acides nucléiques exprimés spécifiquement dans la zone de transfert d'un grain de plante, de préférence des acides nucléiques constitutifs des gènes DD1-a et DD1-b du maïs. L'invention est également relative à des vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'invention ainsi qu'à des cellules hôtes transformées par un acide nucléique ou un vecteur recombinant de l'invention, en particulier des cellules hôtes d'origine végétale.

WO 02/036788 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR 01/03439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C07K14/415 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00
C07K16/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 05785 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ; MAUGENEST SEBASTIEN (FR); PEREZ PASCUAL) 12 February 1998 (1998-02-12) SEQID2 et the whole document	1,2,13, 16,18, 21,22, 25-34
X	WO 00 32799 A (CALGENE LLC) 8 June 2000 (2000-06-08) SEQID13 et the whole document	1,2,4, 16,18, 21,22, 25-34
X	WO 93 09237 A (SANDOZ AG ; SANDOZ AG (DE); SANDOZ LTD (CH)) 13 May 1993 (1993-05-13) the whole document	1,2,16, 18,21, 22,25-34
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2003

Date of mailing of the international search report

28/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 01/03439

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 6 May 1999 (1999-05-06) WALBOT, V.: "leaf primordia cDNA library from Hake lab Zea mays cDNA" XP002176152 accession no. AI657360</p>	1,2,34
X	<p>WO 00 00627 A (MATSUI KENJI ;CALGENE LLC (US)) 6 January 2000 (2000-01-06) see primer AP1</p>	14
X	<p>WO 97 24455 A (CLONTECH LAB INC) 10 July 1997 (1997-07-10) the whole document</p>	14
A	<p>WO 99 50427 A (YAN GUO ;MAX PLACK GES ZUR FOERDERUNG D (DE); SALAMINI FRANCESCO () 7 October 1999 (1999-10-07) the whole document</p>	
A	<p>HUEROS ET AL: "molecular characterization of BET1, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 7, no. 7, June 1995 (1995-06), pages 747-757, XP002116518 ISSN: 1040-4651 cited in the application the whole document</p>	
A	<p>HUEROS GREGORIO ET AL: "Identification of a promoter sequence from the BETL1 gene cluster able to confer transfer-cell-specific expression in transgenic maize." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 121, no. 4, December 1999 (1999-12), pages 1143-1152, XP002176150 ISSN: 0032-0889 cited in the application the whole document</p>	
A	<p>HUEROS GREGORIO ET AL: "Evidence for factors regulating transfer cell-specific expression in maize endosperm." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 41, no. 3, October 1999 (1999-10), pages 403-414, XP002176151 ISSN: 0167-4412 cited in the application the whole document</p>	

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 01/03439

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 02 00905 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 3 January 2002 (2002-01-03) SEQID94 et examples 6,7	1,16,21, 22,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/03439

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **13 Partially**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplementary sheet (FURTHER INFORMATION FROM PCT/ISA/210)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claim no. : 13 partially

The present claim 13 relates to an extremely large number of nucleic acids characterised in that they include at least 12 consecutive nucleotides. However, only a small portion of the nucleic acids claimed are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claim lacks the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appeared supported and disclosed in the above sense, that is the parts relating to sequences SEQ ID NO 13 to 17 and 20 to 32.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 01/03439

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9805785	A	12-02-1998	FR 2751987 A1 AU 3944697 A CA 2261913 A1 EP 0938568 A1 WO 9805785 A1	06-02-1998 25-02-1998 12-02-1998 01-09-1999 12-02-1998
WO 0032799	A	08-06-2000	EP 1144665 A1 JP 2002531096 T WO 0032799 A1	17-10-2001 24-09-2002 08-06-2000
WO 9309237	A	13-05-1993	AU 670417 B2 AU 2920392 A WO 9309237 A1 EP 0611395 A1 HU 66207 A2 IL 103647 A JP 7500965 T ZA 9208538 A	18-07-1996 07-06-1993 13-05-1993 24-08-1994 28-10-1994 01-06-2000 02-02-1995 05-05-1994
WO 0000627	A	06-01-2000	CA 2301856 A1 CN 1321196 T EP 1032694 A2 WO 0000627 A2	06-01-2000 07-11-2001 06-09-2000 06-01-2000
WO 9724455	A	10-07-1997	US 5962271 A EP 0871780 A2 JP 2000502905 T WO 9724455 A2 US 5962272 A	05-10-1999 21-10-1998 14-03-2000 10-07-1997 05-10-1999
WO 9950427	A	07-10-1999	AU 3600299 A WO 9950427 A2 EP 1066394 A2	18-10-1999 07-10-1999 10-01-2001
WO 0200905	A	03-01-2002	AU 7024401 A WO 0200905 A2 US 2002124285 A1	08-01-2002 03-01-2002 05-09-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No

PCT/FR 01/03439

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C07K14/415 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00
C07K16/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 05785 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;MAUGENEST SEBASTIEN (FR); PEREZ PASCUAL) 12 février 1998 (1998-02-12) SEQID2 et le document en entier	1,2,13, 16,18, 21,22, 25-34
X	WO 00 32799 A (CALGENE LLC) 8 juin 2000 (2000-06-08) SEQID13 et le document en entier	1,2,4, 16,18, 21,22, 25-34
X	WO 93 09237 A (SANDOZ AG ;SANDOZ AG (DE); SANDOZ LTD (CH)) 13 mai 1993 (1993-05-13) le document en entier	1,2,16, 18,21, 22,25-34
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 janvier 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/01/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/03439

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'en ligne! 6 mai 1999 (1999-05-06) WALBOT, V.: "leaf primordia cDNA library from Hake lab Zea mays cDNA" XP002176152 accession no. AI657360	1, 2, 34
X	WO 00 00627 A (MATSUI KENJI ; CALGENE LLC (US)) 6 janvier 2000 (2000-01-06) see primer AP1	14
X	WO 97 24455 A (CLONTECH LAB INC) 10 juillet 1997 (1997-07-10) le document en entier	14
A	WO 99 50427 A (YAN GUO ; MAX PLACK GES ZUR FOERDERUNG D (DE); SALAMINI FRANCESCO ()) 7 octobre 1999 (1999-10-07) le document en entier	
A	HUEROS ET AL: "molecular characterization of BET1, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 7, no. 7, juin 1995 (1995-06), pages 747-757, XP002116518 ISSN: 1040-4651 cité dans la demande le document en entier	
A	HUEROS GREGORIO ET AL: "Identification of a promoter sequence from the BETL1 gene cluster able to confer transfer-cell-specific expression in transgenic maize." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 121, no. 4, décembre 1999 (1999-12), pages 1143-1152, XP002176150 ISSN: 0032-0889 cité dans la demande le document en entier	
A	HUEROS GREGORIO ET AL: "Evidence for factors regulating transfer cell-specific expression in maize endosperm." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 41, no. 3, octobre 1999 (1999-10), pages 403-414, XP002176151 ISSN: 0167-4412 cité dans la demande le document en entier	

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deman. nationale No
PCT/FR 01/03439

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	<p>WO 02 00905 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 3 janvier 2002 (2002-01-03) SEQID94 et exemples 6,7</p> <p>-----</p>	<p>1, 16, 21, 22, 25</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale n°
FR 01/03439

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 13 **partially**
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 13 partially

La revendication 13 présente ont trait à une très grande variété d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'ils comprennent au moins 12 nucléotides consécutifs.

Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces acides nucléiques revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité q'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible.

Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux séquences SEQIDs 13 à 17 et 20 à 32.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

renseignements relatifs aux numéros de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/03439

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9805785	A	12-02-1998	FR 2751987 A1	06-02-1998
			AU 3944697 A	25-02-1998
			CA 2261913 A1	12-02-1998
			EP 0938568 A1	01-09-1999
			WO 9805785 A1	12-02-1998
WO 0032799	A	08-06-2000	EP 1144665 A1	17-10-2001
			JP 2002531096 T	24-09-2002
			WO 0032799 A1	08-06-2000
WO 9309237	A	13-05-1993	AU 670417 B2	18-07-1996
			AU 2920392 A	07-06-1993
			WO 9309237 A1	13-05-1993
			EP 0611395 A1	24-08-1994
			HU 66207 A2	28-10-1994
			IL 103647 A	01-06-2000
			JP 7500965 T	02-02-1995
			ZA 9208538 A	05-05-1994
WO 0000627	A	06-01-2000	CA 2301856 A1	06-01-2000
			CN 1321196 T	07-11-2001
			EP 1032694 A2	06-09-2000
			WO 0000627 A2	06-01-2000
WO 9724455	A	10-07-1997	US 5962271 A	05-10-1999
			EP 0871780 A2	21-10-1998
			JP 2000502905 T	14-03-2000
			WO 9724455 A2	10-07-1997
			US 5962272 A	05-10-1999
WO 9950427	A	07-10-1999	AU 3600299 A	18-10-1999
			WO 9950427 A2	07-10-1999
			EP 1066394 A2	10-01-2001
WO 0200905	A	03-01-2002	AU 7024401 A	08-01-2002
			WO 0200905 A2	03-01-2002
			US 2002124285 A1	05-09-2002